

Laserablation mit induktiv gekoppelter Plasma- Massenspektrometrie für die medizinische Diagnostik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Simone Hösl, geb. Hardt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Michael W. Linscheid
 2. Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.01.2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Der Inhalt der geltenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin vom 06. Juli 2009 ist mir bekannt.

Berlin, den 25.08.2016

Simone Hösl

Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Metall-Markierungsverfahren von Antikörpern und deren Anwendung im medizinisch-diagnostischen Bereich für die Detektion mittels LA-ICP-MS, sowie die Entwicklung einer Standardisierungstechnik, stellten die wesentlichen Ziele meiner Dissertation dar. Das Potential der ICP-MS von seinem ursprünglichen Haupteinsatzgebiet in der anorganischen Spurenanalytik von Lösungen wurde durch die Kopplung mit einem Laserablations-System (LA-ICP-MS) vor einigen Jahren erweitert und ermöglicht die direkte Analyse von Feststoffproben wie z.B. biologischen Proben. Das bildgebende Verfahren der LA-ICP-MS findet ein neues Anwendungsfeld durch die Kombination mit medizinischen und biochemischen Methoden, wie in Immunoassays von Gewebeschnitten, Western Blots auf NC-Membranen, Protein-Mikroarrays und in der Analyse von Proteinniveaus. Die Immunhistologie ist eine etablierte diagnostische Methode in der Medizin, um in Gewebeschnitten Tumorzellen oder krankheitsrelevante Proteine zu detektieren. Die Antigene werden über spezifische Antikörper, die bisher meist im Einzelnachweis detektiert. Um aussagekräftigere, multiplexfähige Immunoassays zu entwickeln, wurden Metallkomplexe wie zum Beispiel DOTA-Lanthanoid-Marker, die kovalent an Antikörper gebunden werden, herangezogen und mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie detektiert.

In dieser Arbeit wurde eine neue Markierungsstrategie von Antikörpern mit dem Markierungsreagenz MeCAT (Metal Coded Tag) unter physiologischen Reaktionsbedingungen, sowie deren Anwendung in einem 8-fach Multiplex-Immunoassay von in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten entwickelt. Für eine aussagekräftige LA-ICP-MS Detektion von MeCAT-modifizierten Antikörpern, wurde eine Standardisierung für biologische Proben auf NC-Membranen, basierend auf einer homogenen Aufbringung eines internen Standards und Kalibrierstandards durch einen kommerziell verfügbaren Tintenstrahldrucker entwickelt und mit der ICP-MS Analyse von Lösungen evaluiert. Nach erfolgreicher Evaluierung der Drucktechnik wurde diese an immunhistologischen Mammakarzinom-Gewebeschnitten getestet, um mit der LA-ICP-MS vermittelten Detektion, reproduzierbare 2D Intensitätsprofile, mit einer hohen Bildauflösung und besseren Kontrastierung der positiven Areale zu erreichen. Die interne Standardisierung der LA-ICP-MS wurde in zwei 8-fach Multiplex-Immunoassays von *Tissue Micro Arrays* (TMA) vom Prostatakarzinom und in Maushirngewebeschnitten zur Einschätzung von neurogenerativen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass das Nachweisvermögen, der hier entwickelten Methode bereits ausreicht, um die gängigen klinischen Biomarker mit guter Ortsauflösung nachzuweisen.

Abstract

The aim of my dissertation was the development and application of a new tagging strategy of antibodies used in medical diagnostic and the development of a standardization method by use of LA-ICP-MS. The primary main application of the ICP-MS is the inorganic trace analysis of solutions. Due to coupling the ICP-MS with a laser ablation system (LA-ICP-MS) a few years ago it was possible to expand the potential of this technique for a direct analysis of biological samples. The imaging LA-ICP-MS detection has a wide range of application by combining medical and biochemical methods such as immunoassays of tissue sections, Western blots on NC membranes, protein microarrays and the analysis of characteristic protein levels. The immunohistochemistry (IHC) is used as a medical routine methodology for the visualization of expression levels and the detection of tumor biomarkers in tissue sections. Currently, antigens are quantified already by the reaction with fluorescent labeled antibodies in commercial single-plex approaches. In order to develop new multiplex immunoassays for more significant detection of diseases, metal complexes such as DOTA lanthanide markers (MeCAT) were covalently bound to antibodies and quantified via inductively coupled plasma mass spectrometry.

In this work a new tagging strategy of antibodies with the tagging reagent MeCAT (Metal Coded Tag) was developed under physiological reaction conditions. Their application was proved in an 8-fold multiplex immunoassay of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. For a significant LA-ICP-MS detection of MeCAT tagged antibodies an internal standard and calibration standards for biological samples were developed. The standardization based on a homogeneous deposition onto the NC membrane via conventional CD-ink-jet printer was validated in addition with the ICP-MS analysis of solutions. After successful evaluation the new printing standardization method was applied on an immunohistological breast cancer tissue sections to achieve reproducible 2 D-intensity profiles with higher image resolution, accentuation and contrasting of disease-related antigens in tissue sections. The internal standardization of LA-ICP-MS was successfully applied in two 8-fold multiplex immunoassays for Tissue Micro Arrays (TMA) of prostate cancer and for detection of biomarkers for neurodegenerative diseases in mouse brain tissue sections. In both examples it could be shown that the detection capability of the new tagging strategy in combination with the printing standardization allows the detection of the clinical biomarker with good spatial resolutions.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	5
2	Grundlagen	11
2.1	Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma	11
2.1.1	Aufbau des ICP-MS Systems	12
2.1.2	Probeneintragssysteme ICP-MS	15
2.1.3	Laser Ablation für feste Proben	16
2.2	Antikörper	19
2.3	Modifikationsstellen von Antikörpern	22
2.4	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.5	Western Blotting	25
2.6	Immundetektion	26
2.6.1	Direkte immunologische Nachweismethode	27
2.6.2	Indirekte immunologische Nachweismethode	28
2.6.3	Immunhistochemische Färbung	29
2.6.4	<i>Tissue Micro Array</i>	30
2.7	Antikörpermarkierungen	31
2.7.1	Enzyme-Marker	31
2.7.2	Fluorochrome-Marker	32
2.7.3	Radioaktive Isotopen-Marker	33
2.8	Neue Modifikationsstrategie von Antikörpern	34
2.8.1	Modifikation von Antikörpern mittels MeCAT	35
2.9	Anwendung von klinischen Antikörpern	37
2.9.1	Mammakarzinom	38
2.9.2	Prostatakarzinom	39
2.9.3	Morbus Parkinson	41
2.9.4	Haushaltsproteine	43
2.9.5	Phosphorylierung	44

3	Ergebnisse und Diskussion	45
3.1	Prinzip der Markierungs- und Detektionsstrategie	45
3.2	Optimierung der Markierungsstrategie für die LA-ICP-MS	47
3.2.1	Selektive Reduktion	47
3.2.2	Metall-Markierung der Antikörper mit MeCAT	50
3.2.3	Einfluss des Puffers auf die Antikörpermarkierung	52
3.2.4	Aufreinigung der MeCAT-markierten Antikörper	54
3.2.5	Immunoreaktion mit MeCAT-markierten Antikörper	55
3.2.6	Messung einer LA-ICP-MS Immunoreaktion mit modifizierten Antikörpern	56
3.2.7	Quantifizierung der Metall-markierten Antikörper	58
3.3	Anwendung der MeCAT-modifizierten Antikörpern in der IHC	60
3.3.1	Optimierung der Probenvorbereitung	60
3.3.2	Optimierung der LA-ICP-MS Detektion	61
3.4	Entwicklung eines internen Standards und Kalibrierstandards für die LA-ICP-MS Anwendung	64
3.4.1	Einleitung	64
3.4.2	Entwicklung eines Kalibrierstandards	69
3.4.3	Anwendungsprinzip des Standardisierungs- und Quantifizierungs-Konzeptes für Western Blot Membranen	73
3.5	Anwendung des Standardisierungskonzeptes für Gewebeschnitte	80
3.5.1	Einleitung	80
3.5.2	Standardisierung für die LA-ICP-MS von Gewebeschnitten: Iod vs. Indium	82
3.6	8-fach Multiplex-Ansatz zur Untersuchung von Prostatakarzinomen	88
3.6.1	Einleitung und Prinzip des 8-fach Multiplex-Ansatzes für Tissue Micro Arrays	88
3.6.2	IHC-Färbung an TMA-Gewebeschnitten mit klinisch-relevanten Antikörpern	91
3.6.3	Vergleich des 8-fach Multiplex-Assay sowie die Single-Assays an TMA-Gewebeschnitten via LA-ICP-MS	95
3.6.4	Vergleich zwischen IHC vs LA-ICP-MS	106

3.7	8-fach Multiplex-Ansatz zur Untersuchung von neurodegenerativen Erkrankungen mittels LA-ICP-MS	107
3.7.1	Prinzip des 8-fach Multiplex-Ansatzes	107
3.7.2	Überprüfung des internen Standards	111
3.7.3	IHC-Färbung an Mausgehirngewebeschnitten mit Parkinson-spezifischen Antikörpern im Einzelnachweis	122
3.7.4	LA-ICP-MS Detektion eines 8-fach Multiplex-Ansatz mit Parkinson-spezifischen Antikörpern	125
3.7.5	LA-ICP-MS Detektion vs. IHC-Färbung	131
4	Zusammenfassung und Ausblick	134
5	Material und Methoden	139
5.1	Detektion ICP-MS	139
5.1.1	ICP-MS Analyse von Lösungen	139
5.1.2	Messung an der LA-ICP-MS	141
5.2	Optimierung der Markierungsstrategie	143
5.2.1	Selektive Reduktion mit Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	143
5.2.2	Metall-Markierung der Antikörper mit MeCAT	144
5.2.3	Aufreinigung der markierten Antikörper mittels Mini-Dialyseeinheit	146
5.2.4	Aufreinigung der markierten Antikörper mittels Dialysekapsel	146
5.3	Iodierung von Gewebeschnitten für die LA-ICP-MS	148
5.4	Drucken von Standards für die LA-ICP-MS	148
5.4.1	Drucken von Standards auf NC-Membranen	150
5.4.2	Drucken eines internen Standards auf Gewebeschnitte	151
5.5	Anwendung der MeCAT-markierten Antikörper auf Gewebeschnitten für die LA-ICP-MS Detektion	152
5.5.1	Tissue Micro Arrays (TMA) vom Prostatakarzinom	152
5.5.2	Mausgewebeschnitte zur Untersuchung von Morbus Parkinson	153

5.6	Biochemische Arbeitsschritte	155
5.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford	155
5.6.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	155
5.6.3	Western Blot	157
5.6.4	Dot Blot Membran	158
5.6.5	Immunfärbung mit Alkalischer Phosphatase (AP)	158
5.6.6	Konventionelle IHC-Färbung	159
6	Verwendete Chemikalien	162
6.1	Chemikalien	162
6.2	Protein, Enzyme und Marker	163
6.3	Verwendete Kits	163
7	Abkürzungsverzeichnis	164
8	Anhang	166
8.1	Literaturverzeichnis	203
8.2	Abbildungsverzeichnis	221
8.3	Tabellenverzeichnis	236
8.4	Danksagung	239
8.5	Publikationsliste	240
8.6	Konferenzbeiträge	241

1 Einleitung und Aufgabenstellung

In den letzten Jahren entwickelte sich die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), von seinem ursprünglichen Haupteinsatzgebiet in der anorganischen Spurenanalytik [1] von Metallen in der Halbleiterindustrie und Umweltanalytik, zur quantitativen Analysemethode von bioanorganischen Proben beispielsweise in der Geologie und Biologie. Der Einsatz eines Lasers als Probeneintragssystems bietet hohe Empfindlichkeiten ($> 0,1\text{-}1\text{ppt}$), räumliche Auflösung im μm -Bereich, einen weiten linearen dynamischen Messbereich (bis zu neun Größenordnungen) [2, 3, 4] und Multielement-Fähigkeit, die es ermöglicht die meisten Elemente des Periodensystems [5] simultan zu erfassen. Die ICP-MS Detektion wurde eigentlich zur Analyse von Lösungen mittels Zerstäuber konzipiert [6], jedoch können Feststoffproben durch die Kopplung mit einem Laserablations-System (LA-ICP-MS) [7] ebenfalls analysiert werden. Die LA-ICP-MS kann genutzt werden als eine Analysenmethode mit wenig Probenvorbereitung für die qualitative Bildgebung von endogen gebundenen Metallen, Nichtmetallen [8, 9, 10, 11] und synthetischen Modifikationen in biologischen Proben [12, 13]. Diese Analysemethode ermöglicht einen hohen Probendurchsatz aufgrund der Zeitersparnis durch die simultane Detektion mehrerer Parameter für die klinische Diagnostik [14, 15].

Diese neue Detektionsmöglichkeit von Feststoffproben ermöglicht die Kombination der LA-ICP-MS Analyse mit medizinisch, diagnostischen Methoden wie der IHC-Färbung von Gewebeschnitten. Die erste biologische Anwendung der bildgebenden LA-ICP-MS Detektion wurde von Wang *et al.* [16] 1994 zur Erfassung der Strontium-Verteilung in Fischeschuppen angewendet. In den letzten Jahren ist die LA-ICP-MS für die Detektion von Nichtmetallen wie Phosphor und Selen [17] und Metallen wie Kupfer, Zink, Eisen und Mangan [18] in Gewebeschnitten angewendet worden, um die homogene oder inhomogene Verteilung von Metallo-Proteinen in Korrelation mit Krankheitsbildern zu bringen. Bereits eine geringe Menge von Metallionen wie Ca, Fe, Cu, Zn, Mn, Mg, Co und Mo sind für das Wachstum und die Funktion des Gehirns essentiell [19] und spielen daher eine entscheidende Schlüsselrolle in der Entstehung und Erzeugung von neurodegenerative Krankheiten, wie Morbus Parkinson und Alzheimer [20]. Um die Pathophysiologie von Metallo-Proteinen, Metall-Stoffwechsel und metallhaltigen Proteinablagerungen (wie zum Beispiel Plaques) zu verstehen, wurden bereits Verteilungen von verschiedenen Elementen (C, Na, Mg, P, S, Mn, Fe, Cu,

Zn, Cr usw.) in Mausgehirngewebeschnitten (Maus) mittels LA-ICP-MS untersucht. Diese unterschiedlichen Ansätze sind detailliert in einem Übersichtsartikel von Becker *et al.* [21] zusammengefasst. In den letzten Jahren entwickelte sich die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), von seinem ursprünglichen Haupteinsatzgebiet in der anorganischen Spurenanalytik

Eine vielfältige Anwendung der LA-ICP-MS Detektion für die quantitative Analyse von biologischen und medizinischen Proben wird derzeit noch durch das Fehlen von matrixangepassten internen Standards und Kalibrierstandards für eine reproduzierbare Mikroelementbildgebung von biologischen Proben erschwert. Um die LA-ICP-MS als ein Werkzeug für die klinische Diagnostik nutzbar zu machen, ist es notwendig eine zuverlässige interne Standardisierung zur Korrektur von Laser- und ICP-MS-Schwankungen, sowie zum Ausgleich von Inhomogenitäten der Gewebeschichtdicke, zu etablieren. Ansätze zur internen Standardisierung für feste Probenmatrices sind meist auf natürliche Elementvorkommen begrenzt [22, 23]. Aufgrund der Inhomogenität von biologischen Proben, ist die Wahl des internen Standards auf solche, mit bekannter homogener Verteilung in der biologischen Matrix beschränkt. So wurden zum Beispiel Calciumisotope ($^{43}\text{Ca}/^{44}\text{Ca}$) zur Normalisierung von Zahnproben verwendet, um die Calcium-Heterogenität des Hydroxylapatit in Zähnen zu untersuchen [24, 25]. Da es kein bekanntes Element mit einer homogenen Verteilung in Gewebeschnitten gibt, wurde bisher Kohlenstoff (^{13}C) zur Normierung des Probensignals eingesetzt [26]. Fricke und Günther zeigten jedoch, dass ^{13}C und ausgewählte Metallanalyten sich während der Ablation, sowie in der Gasphase, unterschiedlich verhalten, so dass sich ^{13}C als interner Standard, als nicht geeignet erwiesen hat [27]. Ein weiterer Ansatz zur internen Standardisierung wurde von Giesen *et al.* [28] präsentiert. Dabei wurden die Gewebeschnitte iodiert und das Iodsignal zur Korrektur der Gewebeschichtdicke eingesetzt. Um die bildgebende LA-ICP-MS Detektion präziser zu machen, untersuchte Konz *et al.* [29] und Bonta *et al.* [30] die Anwendung des internen Standards durch die Aufbringung eines Goldfilms auf Gewebeschnitten. Ebenso wurden mehrere Kalibrierungsverfahren für die LA-ICP-MS in der Literatur beschrieben, wie zum Beispiel individuelle laboreigene matrixangepasste Standards [31, 32], um Matrix-Effekte, Schwankungen der abgetragenen Probenmasse und des Materialtransportes sowie instrumentelle Schwankungen zu kompensieren. Für die LA-ICP-MS Analyse wurden zur Kalibrierung unter anderem metalldotierte, homogenisierte Gewebeproben [33, 34, 35], Zellulose oder gepresste Pellets

[36] eingesetzt, sowie flüssige externe Standards, die in einer Dualen-Detektion *online* zugefügt wurden [37]. Die verschiedenen Ansätze zur Normalisierung und Quantifizierungsstrategien wurden in Übersichtsartikeln von Konz *et al.* [38] und Hare *et al.* [5] zusammengefasst. Die Analyse von Gewebeschnitten unter Verwendung von Standards, ist ein wichtiger Schritt für die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der bildgebenden LA-ICP-MS von biologischen Proben.

Bestimmte Krankheitsbilder gehen mit einer charakteristischen Veränderung in der Konzentration von assoziierten Proteinen einher. Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle für die medizinische Diagnostik und werden als Biomarker bzw. als Indikator für das Krankheitsstadium in Gewebeschnitten nachgewiesen. In der klinischen Diagnostik werden die charakteristischen Konzentrationsunterschiede von Proteinen (Antigen) z.B. in Gewebeschnitten für die Identifizierung und Klassifizierung von Tumoren detektiert, um den anschließenden Therapieweg zu bestimmen, während in der Forschung charakteristische Proteinniveaus detektiert werden, um neue Behandlungsstrategien und neue Medikamente wie zum Beispiel für neurogenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson zu entwickeln.

Derzeit wird die Immunhistochemie (IHC) [39] Färbung als ein kommerzielles Routineverfahren für die Visualisierung von Expressionsunterschieden, sowie der intrazellulären Lokalisierung von Biomarkern in Gewebeschnitten auf Objektträgern, eingesetzt. Die IHC-Färbung basiert auf dem Nachweis von krankheitsrelevanten Proteinen (Biomarkern) in diesem Zusammenhang Antigene genannt. Diese werden für zahlreiche Fragestellungen über die Reaktion mit markierten Antikörpern qualitativ nachgewiesen. Obwohl die IHC-Färbung im klinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt wird, bleibt eine laborübergreifende Standardisierung, Bewertung der Reproduzierbarkeit und eine Quantifizierung, eine anspruchsvolle Herausforderung. [40, 41] Für eine reproduzierbare IHC-Färbung wurden *Tissue Micro Array* (TMA)-Gewebeschnitte [42] von Biopsieproben entwickelt, um statistisch signifikante Ergebnisse, für bis zu 1000 verschiedene Biopsieproben pro Objektträger, zu liefern.

Markierte Antikörpermoleküle können für die Früherkennung bzw. Behandlung von Krebs oder zur Entwicklung von Medikamenten eingesetzt werden. Antikörper sind Teil der körpereigenen Immunabwehr, zur spezifischen Bekämpfung von Krankheitserregern bzw. Antigene. Aufgrund ihrer hohen Selektivität und dem daraus resultierenden potentiellen Nutzen in Detektionssystemen der Diagnostik und Pathologie, fand in den letzten Jahren eine

Entwicklung von neuen, möglichst aussagekräftigen Markierungsstrategien für Proteine und Antikörper statt. Dabei werden Antikörper zur Detektion von Antigenen, über die Bildung sogenannter Antikörper-Antigen-Konjugate eingesetzt. So kann die hohe Spezifität bzw. Affinität zwischen Antikörpern und Antigenen genutzt werden. Diese physikochemische Wechselwirkung ist reversibel und ähnelt einem Schlüssel-Schloss-Prinzip, was bedeutet, dass die Antikörperbindungsstelle, auch Bindungs epitop genannt, zu der Antigenbindung komplementär ist [43]. Die Techniken der immunologischen Nachweismethoden unterscheiden sich in der Anzahl der markierten Antikörper pro nachzuweisendes Antigen. Die am häufigsten eingesetzten Marker basieren auf Enzymen, Fluorophoren und radioaktiven Isotopen. In bisherigen etablierten Verfahren mit Enzymen oder radioaktive Isotopen erfolgt die Detektion meist im Einzelnachweis, oder bei Fluorophoren mit maximal bis zu sieben unterschiedlichen Parametern [44]. Neben diesen etablierten Detektionsmethoden lassen sich auch neue Ansätze mit Metall-markierten Antikörpern über die Massenspektrometrie realisieren [45].

Die Kombination von medizinisch diagnostischen Arbeitstechniken, wie zum Beispiel der IHC-Färbung mit der LA-ICP-MS als Detektionssystem ist vielversprechend. Eine der ersten Immuntests unter Verwendung Metall-modifizierter Antikörper mit LA-ICP-MS als Detektionsprozess wurde von Hutchinson *et al.* [46] und Müller *et al.* [47] angewendet. Diese Anwendungen führten zur Entwicklung von zahlreichen Markierungsreagenzien, die zu einer schnellen Verbesserung der Detektionsempfindlichkeit von Proteinen mit geringer Konzentration führte. Zang *et al.* [48] zeigte die erste ICP-MS Anwendung eines biotinylierten monoklonalen Antikörpers, der mit einem Europium beladenen SCN-DTTA (N'-(p-Isothiocyanatbenzyl)-diethylentriamin-N1, N2, N3, N3- acetat -Eu³⁺), einem linearkettigem Chelat, modifiziert wurde. Dieser Ansatz ermöglichte die simultane Analyse von mehreren Parametern in komplexen Serumproben gleichzeitig, in einem sogenannten Multiplex-Ansatz. Waentig *et al.* entwickelte eine Markierungsstrategie für primäre Antikörper mit einem Lanthanid beladenen p-SCN-Bn-DOTA-Komplex (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecan-1, 4, 7, 10-tetra-essigsäure) [49, 50] für die Untersuchung von chemisch induzierter Expression von Cytochrom-P450 (CYP) in einem 5-fach Multiplex Western Blot Immunoassay [51]. Die Markierungsstrategie wurde von Giesen *et al.* genutzt, um drei Krebsmarker in Brustgewebeschnitten mittels LA-ICP-MS nachzuweisen [52]. Ein ähnliches Prinzip verwendet de Bang *et al.* [53] für die Analyse von

mehreren Pflanzenproteinen in einem Western Blot Immunoassay. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde von Lou *et al.* [54] ein Polymermarkierungsreagenz beladen mit Lanthaniden (ca. 30 DTTA Chelate) entwickelt, um verschiedene Antikörper zu modifizieren und so unterschiedliche Leukämie-Zellen in Blutproben simultan mittels ICP-MS zu detektieren. Eine wachsende Zahl von elementmarkierten Antikörpern sind für die bildgebende LA-ICP-MS in der Entwicklung [55, 52].

In dieser Doktorarbeit soll im Rahmen eines Technologie-Transfer-Projektes des BMWi (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie) mit der Proteome Factory AG ein neues Metall-basierendes Markierungsverfahren von Antikörpern und deren Anwendung im medizinisch diagnostischen Bereich entwickelt, und deren Detektion durch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma (ICP-MS) erprobt werden. Dazu wurde ein DOTA-Lanthanoid-Marker (*Metal Coded Tags*, MeCAT) ausgewählt, welcher sich bereits für die Protein- bzw. Peptidquantifizierung etabliert hat. Das Markierungsreagenz MeCAT wurde zum erstes Mal von Ahrends *et al.* [56] zur Modifikation von Proteinen, in Kombination mit biochemischen Arbeitsabläufen, zur relativen Quantifizierung von Augenlinsenproteinen (*Sus scrofa*) mittels ICP-MS und ESI-MSⁿ eingesetzt. Esteban-Fernández *et al.* [57] nutzte MeCAT für die absolute Quantifizierung von Standardproteinen, wie zum Beispiel BSA, unter denaturierenden Bedingungen mittels LC-ICP-MS. Die ersten Forschungsarbeiten zur Markierung von Proteinen mit Metallen, speziell mit Lanthaniden, zeigten bereits das Potential auf, aber bisher wurden MeCAT-Reagenzien noch nicht für die Antikörpermarkierung und deren Anwendung in Immunoassays genutzt.

Der Schwerpunkt meiner Dissertation ist die Entwicklung einer Markierungsstrategie von Antikörpern und deren Anwendung, unter Verwendung der MeCAT-Reagenzien [55]. Das MeCAT-Reagenz besteht aus einem Chelatbildner (DOTA), der trivalente Metalle (z.B. Lanthanoiden) komplexiert und einem Maleimid-Linker, welcher bei neutralem pH-Wert kovalent an Thiolgruppen von Antikörpern bindet. Dazu müssen jedoch die Disulfidbrücken im Antikörper durch ein selektives Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) unter physiologischen Reaktionsbedingungen geöffnet werden. Dabei darf die Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung nicht beeinträchtigt werden. Zu diesem Zweck musste das optimale Konzentrationsverhältnis von Antikörper zu Reduktionsmittel, unter möglichst milden Reaktionsbedingungen, sowie die

optimale Inkubationszeit für die selektive Reduktion ermittelt werden. Des Weiteren sollte der optimale MeCAT-Überschuss, sowie Aufreinigungsverfahren zur Entfernung von Reagenzüberschüssen für die Markierung von Antikörpern bestimmt werden. Für die Methodenentwicklung wurden einfache Modellproteine und deren Antikörper, mit Hilfe von biochemischen Arbeitstechniken eingesetzt.

Zur Überprüfung des Konzeptes sollten möglichst komplexe, reale Fragestellungen aufgegriffen werden, weshalb diagnostische Biomarker in einem Multiplex-Ansatz, orts aufgelöst in Gewebeschnitten massenspektrometrisch detektiert wurden. Dabei sollte jeder eingesetzte Antigen-spezifische Antikörper mit einem anderen Lanthanid markiert werden und mit konventionellen biochemischen Arbeitsabläufen, wie zum Beispiel Western Blot Immunassays oder IHC-Färbungen, erprobt und mit dem bildgebenden Verfahren der LA-ICP-MS ausgelesen werden. Es wurden zwei Konzepte entwickelt in denen acht Antikörper gleichzeitig eingesetzt und über die LA-ICP-MS detektiert werden sollten.

Eine besondere Herausforderung stellt dabei die Entwicklung von Standardisierungs- und Kalibrierungsprotokollen für eine Anwendung in der bildgebenden LA-ICP-MS von biologischen Proben dar. Es sollte eine universell einsetzbare interne Standardisierung, ohne chemische Modifikation der biologischen Proben entwickelt werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung und Optimierung wurde ein kommerzieller Tintenstrahldrucker eingesetzt, um Lanthanid-versetzte Tinten, homogen auf Gewebeschnitten zu drucken. Die Optimierung und Bestimmung der Druckparameter erfolgte zunächst auf einer Nitrocellulose (NC)-Membranen als Standardmaterial, um zu zeigen, dass die Standardisierung für die Anwendung der LA-ICP-MS geeignet ist. Die Leistungsfähigkeit der Drucktechnik sollte in einem direkten Ansatz für alle Arten von Metallen in Proteinen, und in einem indirekten Ansatz für alle Arten von Immunoassays mit Metall-modifizierten Antikörpern auf Western Blot Membranen erprobt werden. Alle Experimente sollten mit der ICP-MS mit flüssigem Probeneintragssystem evaluiert werden, bevor am Beispiel von in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Mammakarzinom-Gewebeschnitten, die Vorteile des gedruckten internen Standards präsentiert werden sollten. Weiterhin sollten unter standardisierten Bedingungen zwei 8-fach Multiplex-Ansätze an einem *Tissue Micro Array* (TMA) vom Prostatakarzinom und an 176 Mausgehirngewebeschnitten zur Detektion von Morbus Parkinson erprobt werden.

2 Grundlagen

2.1 Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) [58] ist eine sehr empfindliche Analysemethode für die anorganische Massenspektroskopie und wurde von Houk und Gray eingeführt. [59] In den letzten Jahrzehnten hat sich die anorganische Massenspektroskopie durch die erweiterte Anwendung der Plasmaionisation zu einer schnellen, universellen und leistungsfähigen Methode entwickelt, die eine Multielementdetektion im Spuren- und Ultraspurenbereich von Umweltproben, medizinischen, geologischen und radioaktiven Materialien, sowie technischen Produkten ermöglicht [60]. Dieser große Anwendungsbereich der anorganischen Massenspektroskopie umfasst die Detektionsmöglichkeit mit einer hohen Analysenempfindlichkeit für ein breites Elementspektrum, von gasförmigen, flüssigen und festen Probenmaterialien durch die einfache Kopplungsfähigkeit mit unterschiedlichen Probeneinlaßsystemen. [7] Die ICP-MS entwickelt sich zunehmend zu einer Routinemethode, bedingt durch niedrige Nachweisgrenzen (ppt-ppq), [5] einen großen dynamischen Messbereich (bis zu neun Größenordnungen), [2, 3, 4] die relativ hohe Toleranz gegenüber Salzverbindungen und damit kaum vorhandenen Matrix-Effekten, den Einsatz von kleinsten Probenvolumina (μL). Diese Methode ermöglicht somit eine sehr empfindliche zielorientierte Multielementdetektion [5] und eignet sich hervorragend durch die einfache Kopplungsfähigkeit mit einem Laserablations-System (LA-ICP-MS) [7] zur direkten Analyse von Feststoffproben. Diese neue Detektionsmöglichkeit von Feststoffproben ermöglicht uns die Kombination der LA-ICP-MS Analyse mit medizinischen diagnostischen Methoden, wie der IHC-Färbung von Gewebeschnitten. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der ICP-MS ein neues Konzept zur Multiplex-Analyse von Biomarkern, zur Prostatakarzinom-Detektion und zur Untersuchung von Morbus Parkinson-Erkrankung erprobt werden.

2.1.1 Aufbau des ICP-MS Systems

Der allgemeine Aufbau der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) besteht aus einer Probeneintragsvorrichtung, einer Anregungs- und Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektionssystem. Es wurden zwei unterschiedliche Probeneintragssysteme genutzt. Für flüssige Proben wurde ein selbstansaugender MicroFlow Zerstäuber und für feste Proben eine Laserablationssystem eingesetzt (siehe Abbildung 1). Beide Systeme werden detailliert in den Abschnitten 2.1.2 beschrieben. Als Ionisierungsquelle wird ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP) eingesetzt [61]. Die hohe Ionendichte und die hohe Temperatur des Plasmas bieten eine ideale Atomisierung und Elementionisierung für alle Arten von Proben und Matrices. Das Plasma wird in einer Torch erzeugt und besteht aus drei konzentrischen Quarzglasröhren durch die ein leicht ionisierbarer Argongasstrom geleitet wird. Das Proben-Aerosol gelangt mittels Trägergas ($0,4\text{--}1,0\text{ L min}^{-1}$) durch die innerste Röhre in das Plasma (siehe Abbildung 1). Die beiden anderen Röhren werden für das Kühlgas und das Hilfsgas benötigt. Das Hilfsgas wird zur zusätzlichen Kühlung eingesetzt. Der vordere Bereich der Torch ist von einer Induktionsspule aus Kupfer umwickelt. Diese Spule ist an einen Hochfrequenzgenerator (27 MHz) angeschlossen und erzeugt ein oszillierendes elektromagnetisches Feld, welches das Plasma aufrechterhält. Das elektromagnetische Wechselfeld erzeugt im Argongas einen Induktionsstrom. Durch den Funken einer Teslaspule wird das Plasma gezündet und ein Teil des Gases ionisiert. Das führt zu einer lawinenartigen Ionisation und liefert freie Elektronen, die mit dem Magnetfeld koppeln können. Das Proben-Aerosol wird im Plasma bei einer Temperatur zwischen 6000 K und 8000 K unter Normaldruck verdampft [62], atomisiert und ionisiert, es entstehen dabei positiv geladene und auch mehrfach geladene Ionen und Molekülionen. Die gebildeten Ionen werden aus dem Normaldruckbereich in den Hochdruckbereich extrahiert und in einem Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt. Die gebildeten Ionen gelangen über einen gekühlten *Sampler* in einen Zwischenraum (*Interface*), der durch eine mechanische Vakuumpumpe evakuiert ($\sim 1\text{ Pa}$) wird. Aus der Zwischenkammer gelangen die Ionen durch einen *Skimmer* in den Hochvakuumbereich ($\sim 10^{-4}\text{ Pa}$). Der *Sampler* und *Skimmer* bestehen meistens aus Nickel und werden mit Wasser gekühlt. Hinter dem *Skimmer* befindet sich eine negativ-geladene Ionenlinse, welche die positiv geladenen Ionen der Probe fokussieren und gleichzeitig von Lösungsmittelresten, neutralen Teilchen, Elektronen und Photonen befreit [63] und in den Massenanalysator überführt (Abbildung 1).

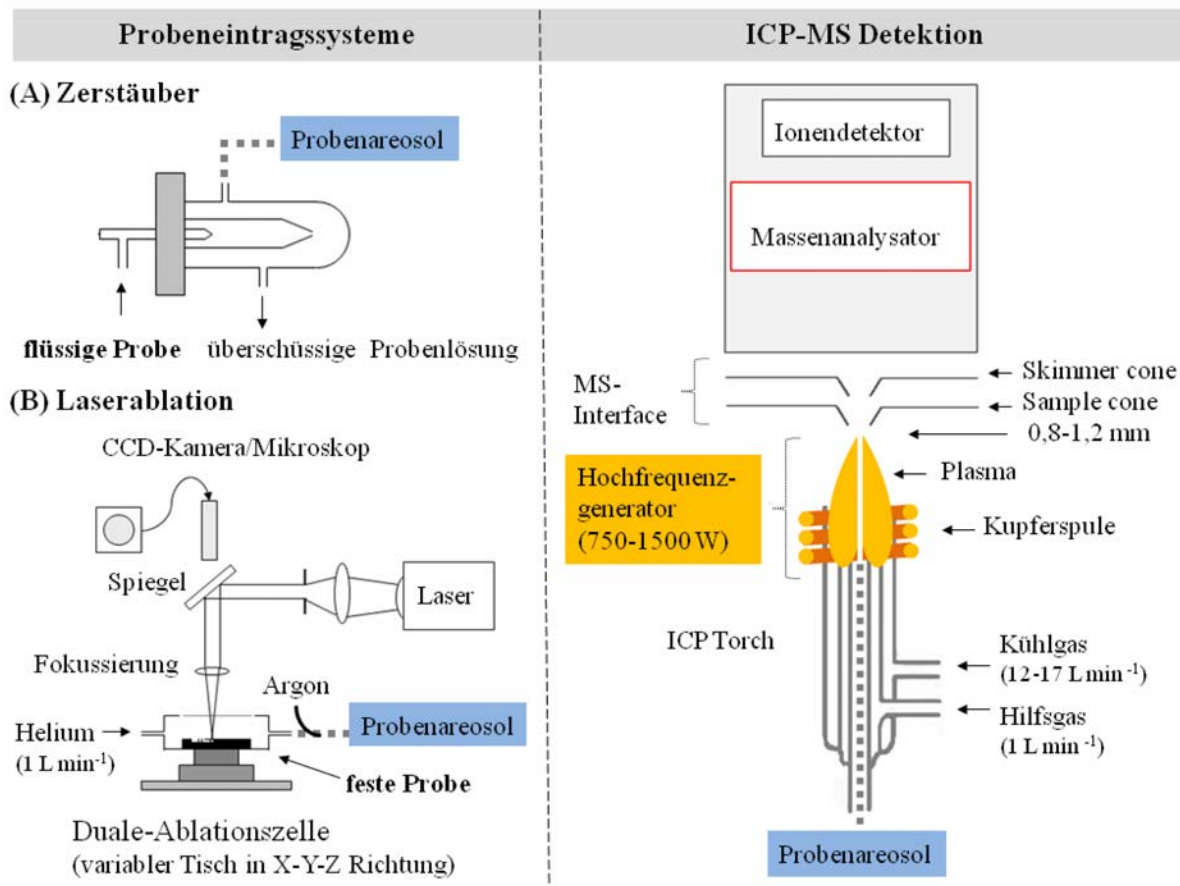


Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines ICP-MS [64] mit zwei unterschiedlichen Probeneintragssystemen.

Im Fall des Sektorfeld ICP-MS (Element XR), welches für diese Arbeit eingesetzt wurde, erfolgt die Massenanalyse über ein doppelfokussierendes Massenspektrometer, in dem die Ionen zuerst durch ein magnetisches Feld und dann durch einen elektrostatischen Analysator (ESA) [65] geleitet werden. Die geladenen Ionen werden im magnetischen Feld nach ihrer Masse bzw. nach ihrem entsprechendem Impuls ($m \cdot v$) getrennt. Alle Ionen erfahren durch das Anlegen einer Beschleunigungsspannung die gleiche kinetische Energie im elektrischen Feld, so dass das Magnetfeld (B-Feld) die Ionen nur noch hinsichtlich ihrer Masse trennt. Durch Variierung des Magnetfelds werden unterschiedliche Massen richtungsfokussiert und man kann einen großen, lückenlosen Massenbereich in Form eines Massenspektrums aufzeichnen (B-Scan). Der ESA gleicht Unterschiede der kinetischen Energie aus, die bei der

Überführung der Ionen aus dem Plasma entstehen können aus. Dies führt zu niedrigeren Untergrundintensitäten und verbessert die Auflösung der Signale. Das doppelfokussierende Massenspektrometer verfügt neben dem B-Scan auch über einen sogenannten elektrischen Scan Modus (E-Scan). Der E-Scan arbeitet mit einer konstanten magnetischen Induktion. Die Trennung erfolgt durch die Variierung der Beschleunigungsspannung v bei konstanter ESA Spannung, so erhalten die Ionen unterschiedliche kinetische Energien und werden nacheinander in den Detektor geleitet. Als Detektor dienen ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) und ein zusätzlicher Faraday-Detektor. Der SEV besteht in diesem Fall aus 15 bis 17 Dynoden, die mit einem Metalloxid beschichtet sind. Am Eingang des Elektronenvervielfachers wird eine negative Spannung angelegt, die die positiven Ionen aus dem Massenanalysator anzieht. Die Ionen treffen auf die Metalloxidschicht und schlagen dabei Sekundärelektronen aus dieser Schicht. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes werden die Sekundärelektronen auf die nächste Dynode gelenkt, wo sie weitere Elektronen aus der nächsten Metalloxidschicht schlagen. Am Ende der Signalverstärkung werden die Elektronen als elektrisches Signal detektiert. Die Rohdaten der Signale haben die Einheit *counts per second* (cps; Puls pro Sekunde). Der Sekundärelektronenvervielfacher verfügt über zwei Messmodi (Counting und Analog) und zusätzlich wird ein Faraday-Detektor für hohe Ionenströme von $5 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^{12}$ cps eingesetzt. Im Analog-Modus entspricht der gemessene Strom einem Signal von $5 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^9$ cps. Sehr kleine Ionenströme werden über Dynoden signalverstärkt und im Counting-Modus von $0,2$ - $5 \cdot 10^6$ cps gemessen. Die beiden Detektionsbereiche müssen in regelmässigen Abständen kreuz-kalibriert werden, um eine Umrechnung der gemessenen Signalintensitäten von dem einen Modus in den anderen Modus zu gewährleisten. Durch den Signalabgleich des Dual-Mode-Detektors lässt sich der dynamische Bereich um drei Grössenordnungen erweitern.

Das doppelfokussierende Massenspektrometer bietet die Vorteile einer hohen Massenauflösung ($R \leq 10.000$), niedrigen Untergrundsignalen, guten Empfindlichkeiten und hervorragenden Genauigkeiten, mit niedrigen relativen Standardabweichungen für die Multielement-Bestimmung bzw. Quantifizierung von Analyten.

2.1.2 Probeneintragssysteme ICP-MS

2.1.2.1 Zerstäubersystem für flüssige Proben

Flüssige Proben werden entweder durch den Probengasstrom angesaugt, oder mit Hilfe einer Pumpe zur Gewährleistung gleichmäßiger Volumenströme an Probelösungen, zum Zerstäubersystem transportiert (siehe Abbildung 1(A)). Das Zerstäubersystem hat die Aufgabe, ein möglichst feines Aerosol mit einer homogenen Tröpfchenverteilung und einer kleinen Tröpfchengröße (ca. 10 µm Durchmesser) zu erzeugen. Die flüssige Probe wird im Zerstäuber mit Hilfe eines Zerstäubergases (Argon) in ein Aerosol überführt. Damit nur ein sehr feines Aerosol mit dem Zerstäubergasstrom in das Plasma gelangt, befindet sich der Zerstäuber in einer Sprühkammer, die zur Abscheidung der großen Tröpfchen vom Gasstrom dient. Der überwiegende Teil des Aerosols wird in der Sprühkammer abgeschieden, und es gelangen nur ca. 1-5% der Probe in das Plasma [66]. Das Zerstäubersystem wird eingesetzt um flüssige Proben zu detektieren und zur Kalibrierung des Detektors, sowie zur Massenkalisierung des Sektorfeld ICP-MS (siehe Material und Methoden 5.1). Die konstanten Signalhöhen wurden integriert, und die daraus resultierenden Flächen, bezogen auf den internen Standard zur Quantifizierung verwendet. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden Messparametern (siehe Tabelle 15).

In dieser Arbeit wurde die ICP-MS von Lösungen eingesetzt, um den durchschnittlichen Markierungsgrad, also den durchschnittlichen Metallgehalt pro Antikörper, zur Optimierung der Markierungsstrategie zu bestimmen (siehe Material und Methoden 5.1.1.1). Zusätzlich wurde der Metallgehalt pro Proteinbande auf den Nitrocellulose (NC) -Membranen bestimmt. Dafür wurden die getrennten, geblotteten Proteinbanden auf den Membranen mittels Ponceau S reversibel angefärbt, ausgeschnitten und für die ICP-MS Detektion aufgelöst (siehe Material und Methoden 5.1.1.2). Desweiteren wurde zur Bewertung der neu-entwickelten Standardisierung, der Metallgehalt der Standards auf den NC-Membranen quantifiziert (siehe Material und Methoden 5.4.1).

2.1.3 Laser Ablation für feste Proben

Für die direkte Analyse von festen geologischen oder biologischen Proben wird die Laser-Ablations-ICP-MS (LA-ICP-MS) eingesetzt. Dafür wurde ein kommerzielles Lasersystem (New Wave 213, ESI, Portland, USA) mit einem Strahlaufweiter und einer Laserspotgröße von 4 μm bis 250 μm mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS, Element XR, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gekoppelt und durch externe Triggerung synchronisiert. Das Triggersignal wurde vom MS gesendet, wenn die Ablation beginnt. Mit dem Laser werden energiereiche Photonen über ein Linsensystem auf die Probenoberfläche fokussiert. Abhängig von den Materialeigenschaften, der Wellen- und Pulslänge werden kleine Partikel, Atome und Ionen aus dem Probenmaterial herausgerissen, so dass über der Probenoberfläche ein Aerosol entsteht. Dieses Aerosol wird dann mit Hilfe eines Transportgases (Helium) zum ICP-MS transportiert [67] und dort atomisiert, ionisiert und im Massenanalysator nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis detektiert (siehe Abbildung 2).

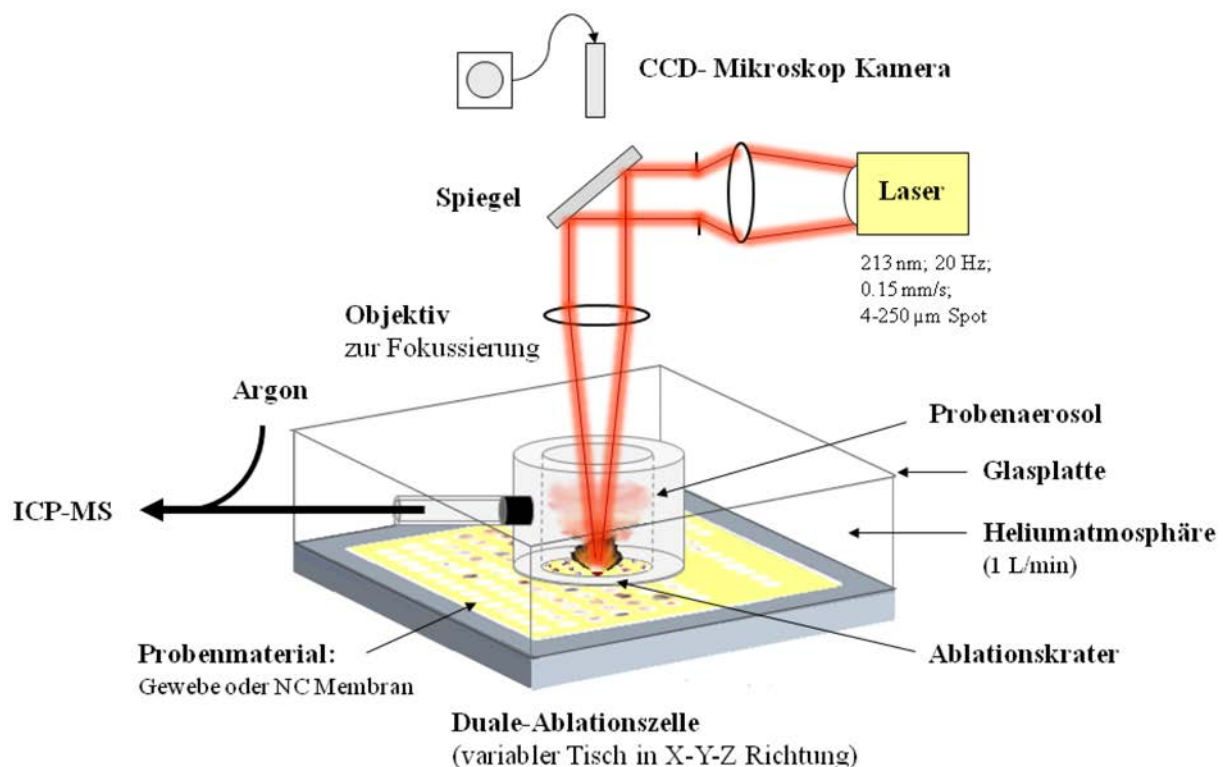


Abbildung 2 Schematischer Aufbau der Dualen-Ablationszelle und Kopplung mit dem ICP-MS.

Für eine optimale LA-ICP-MS Detektion müssen zunächst die instrumentellen Parameter wie Gasflüsse, Einstellungen der Ionenlinsen und die HF-Leistung mittels Analysen von Lösungen unter Verwendung einer Tune-Lösung optimiert werden (siehe Kapitel 2.1.2.1, Material und Methoden 5.1.1). Nach jeder Kopplung mit dem Laser erfolgt eine weitere Optimierung des Systems durch die Ablation eines Glasobjektträgers. Dabei wird auf eine maximale Ionenintensität von Barium unter Berücksichtigung der Oxid-Rate von $\text{ThO}/\text{Th} < 3\%$ und einem RSD von $\text{Th} \leq 5\%$ optimiert. Die Ablation erfolgte unter sonst festen Parametern (siehe Material und Methoden 5.1.2). Der Glasobjektträger, oder die jeweilige Probe (NC-Membranen, Gewebeschnitte) werden auf einem Probenhalter fixiert und in die druckdichte duale Ablationszelle eingeführt. Die Zelle wird mit Helium als Transportgas durchströmt. Nach Fokussierung des Lasers wird das Probenaerosol generiert. Die Proben werden im Linienscan-Modus zeilenförmig vollständig abgetragen (siehe Abbildung 3B) und direkt mit Hilfe des Transportgases zum ICP-MS geleitet. Zur Verdünnung des Aerosols wird ein Hilfsgas Argon vor dem Plasma zugefügt und ins ICP-MS geleitet.

Um eine vollständige Abtragung der Proben zu gewährleisten wurde im "*Differential Scanning Modus*" [68] ablatiert (siehe Abbildung 3A).

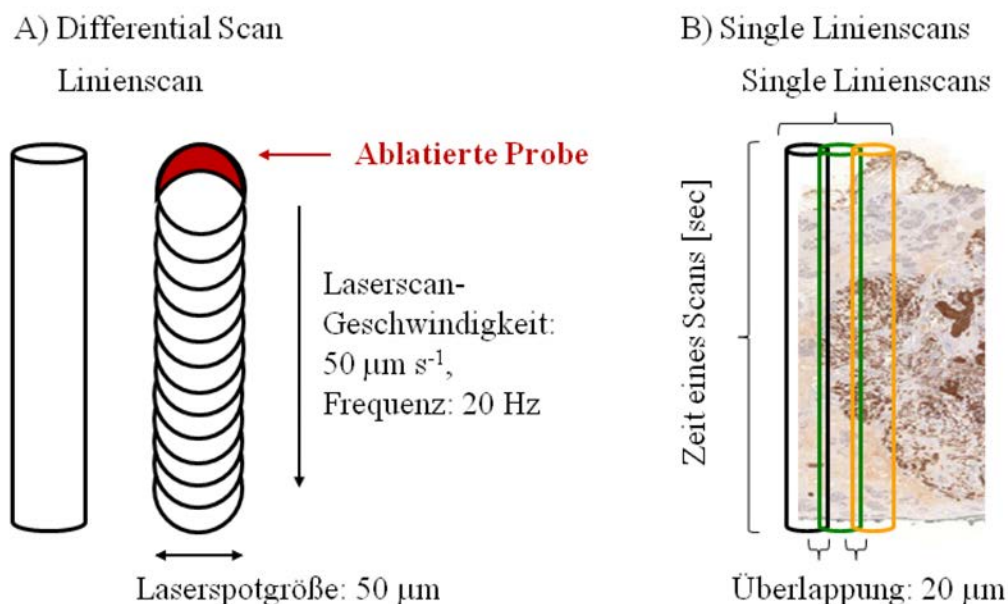
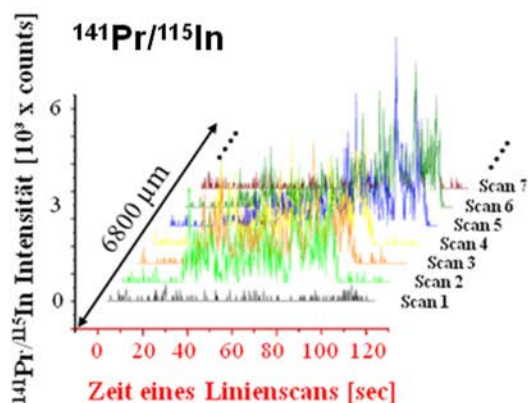


Abbildung 3 Schematische Darstellung des *Differential Scanning Modus* (A) und des Linienscans (B).

Dafür muß die Laserenergie so optimiert sein, dass die Probe vollständig mit jedem Laserschuss abgetragen wird, ohne dass benachbarte Probenareale beeinträchtigt werden. Die Laserscangeschwindigkeit und die Frequenz müssen an die Laserspotgröße angepasst werden, so dass es zu einer starken Überlappung der einzelnen Laserspots kommt. Durch die Überlappung wird pro Laserschuss eine kontinuierliche sichelförmige Fläche der Probe vollständig abgetragen (siehe Abbildung 3A, rote Markierung). Ein Linienscan setzt sich aus mehreren einzelnen Laserschüssen einer Laserspotgröße zusammen. Um die Probe zu detektieren werden mehrer Linienscans aneinandergereiht (siehe Abbildung 3B). Bei jedem Laserabtrag bleibt ein kleiner Rand der Probe um den Linienscan stehen. Damit die Probe vollständig abgetragen wird müssen sich die Linienscans um ca. 15-20 μm überlappen, (siehe Abbildung 3B). Diese Überlappung führt zu einer Verringerung der Laserspotgröße und einer Verbesserung der Bildauflösung. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte mit optimierten Laserparametern in Anlehnung zu der Arbeit von Giesen *et al.* [28]. Dabei werden die Laserspotgrößen proportional zur Laserscangeschwindigkeit variiert und eine Laserfrequenz von 20 Hz sowie eine Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%) eingesetzt (siehe Material und Methoden; Tabelle 16).

(A) Single Linienscans



Umrechnung

(B) 2D Intensitätsprofil

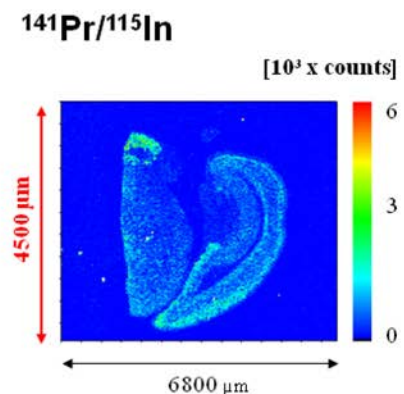


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Umwandlung eines Single Linienscans (A) eines Lanthanidsignals in ein 2D Intensitätsprofil (B) durch die Umrechnung der Scan Zeit in den Mikrometermaßstab.

Die akquirierten Daten der einzelnen Linienscans (siehe Abbildung 4 (A) für das jeweilige Lanthanidelement wurden mit Hilfe eines Matlab Programms (MathWorks,USA), entwickelt von Dr. P. Lampen am ISAS (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften), zusammengefasst, um die Daten für die Auswertung in das Programm Microsoft Excel

(Microsoft, Redmond WA, USA) und anschließend in das Programm Origin 8.1 (Originlab Corporation Northhampton, USA) exportieren zu können. Anschließend wurden die 2D Intensitätsprofile, oder auch sogenannte farbcodierte Oberflächenprofile (siehe Abbildung 4(B)) für jedes Lanthanid mit dem Programm Origin erstellt, und zwar durch die Umrechnung der Scan-Zeit in einen Mikrometermaßstab (siehe Abbildung 4(A, B)). Die LA-ICP-MS Detektion bietet ein vielfältiges Anwendungsgebiet und wird derzeit noch durch das Fehlen von kommerziell erhältlichen matrixangepassten internen Standards und Kalibrierstandards eingeschränkt. Es gibt unterschiedliche Ansätze zur Standardisierung der LA-ICP-MS, wie natürlich homogene Elementvorkommen, künstlich beigelegte, oder auf die Probenoberfläche aufgetragene Elemente und individuelle matrixangepasste Standards (siehe Einleitung 1). Derzeit gibt es noch kein geeignetes Quantifizierungskonzept für die LA-ICP-MS Analyse von festen Proben wie z.B. von Gewebeschnitten für die klinische Diagnostik.

Deshalb ist die wesentliche Aufgabe der Dissertation die Entwicklung eines Standardisierungsverfahrens für die LA-ICP-MS Detektion durch den Einsatz einer neuartigen Drucktechnik. Diese soll für die Korrektur von Laser- und ICP-MS-Schwankungen, sowie zum Ausgleich von Gewebelücken genutzt werden.

2.2 Antikörper

Antikörper [43], auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Proteine (Eiweiße) aus der Klasse der Globuline. Das Immunsystem verwendet sie zur Erkennung und Neutralisierung von Fremdstoffen, wie Bakterien, Viren oder große Makromoleküle, den sogenannten Antigenen. Die Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen erfolgt mit einer relativ hohen Spezifität und Affinität analog einem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Diese Bindung beruht auf physikochemischen Wechselwirkungen und ist reversibel. Antikörper gehören zu dem körpereigenen Immunsystem und sind die Antigen-spezifischen Produkte von B-Zellen (B-Leukozyten) [69]. In Wirbeltieren gibt es fünf verschiedene Hauptformen (Isotypen) von Immunglobulinen, die anhand ihrer unterschiedlichen Gen-Abschnitte für die konstanten Bereiche der schweren Kette eingeteilt werden, und die auf unterschiedliche Immunwirkungsmechanismen spezialisiert sind. Die fünf unterschiedlichen Isotypen besitzen unterschiedliche Konformationen. Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin E (IgE) und

Immunglobulin G (IgG) liegen als Monomer vor, das Immunglobulin A (IgA) als Dimer und das Immunglobulin M (IgM) als Pentamer (Abbildung 5) [70].

Antikörper des Immunglobulin G (IgG) Typs bestehen aus vier Polypeptidketten, die grundlegende strukturelle Einheit besteht aus zwei identischen leichten Ketten (*light chain*, L) und zwei identischen schweren Ketten (*heavy chain*, H) die kovalent durch Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind (Abbildung 6). Die beiden leichten Ketten haben jeweils ein Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa und enthalten ca. 210 Aminosäuren, die beiden schweren Ketten hingegen bestehen aus 450 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa.

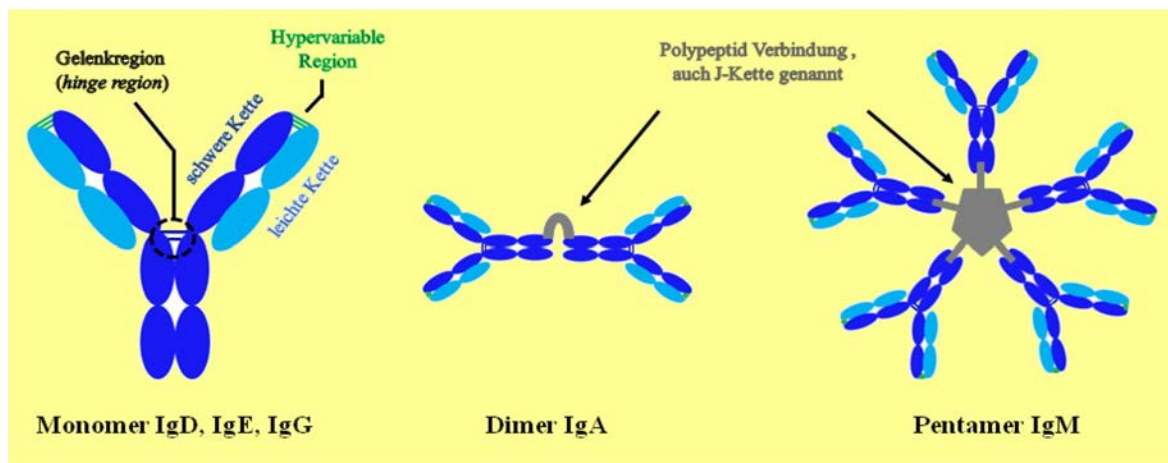


Abbildung 5 Immunglobulin-Klassen [71].

Die leichte Kette, in Abbildung 6 hellblau dargestellt, besteht aus jeweils einer variablen Domäne V_L und einer konstanten Domäne C_L . Demgegenüber besitzt die schwere Kette, in Abbildung 6 dunkel blau dargestellt, eine variable und drei (IgG, IgA) oder vier (IgM, IgE) konstante Domänen (vgl. auch Abbildung 5). Diese werden analog als V_H , C_H^1 , C_H^2 und C_H^3 bezeichnet. Daher herrscht eine besonders hohe Variabilität an den Enden des Ypsilon-förmigen Antikörpers. Die variablen Domänen der leichten und schweren Ketten des Immunglobulins bilden gemeinsam das Bindungsepitop für das Antigen. Zwischen den ersten beiden konstanten Domänen der schweren Kette befindet sich ein gering strukturiertes Bereich die sogenannte Gelenkregion (*Hinge Region*), die für eine große räumliche Flexibilität der F_{ab} Region sorgt. Das F_{ab} Fragment oder auch F_{ab} -Antikörper (*Fragment antigen binding*) ist das antigenbindende Fragment eines Immunglobulins. Dieses Fragment wird aus dem N-terminalen Ende der leichten und schweren Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind, aufgebaut.

Das F_C Fragment besteht aus dem C-terminalen Ende der beiden schweren Ketten und enthält in der C_H^3 Domäne eine F_C -Rezeptor-Bindungsstelle. Dieser Rezeptor bindet bzw. markiert bestimmte Zellen oder Mikroorganismen, damit diese als körperfremd erkannt und von Abwehrzellen eliminiert werden können (sogenannte sekundäre Immunreaktion).

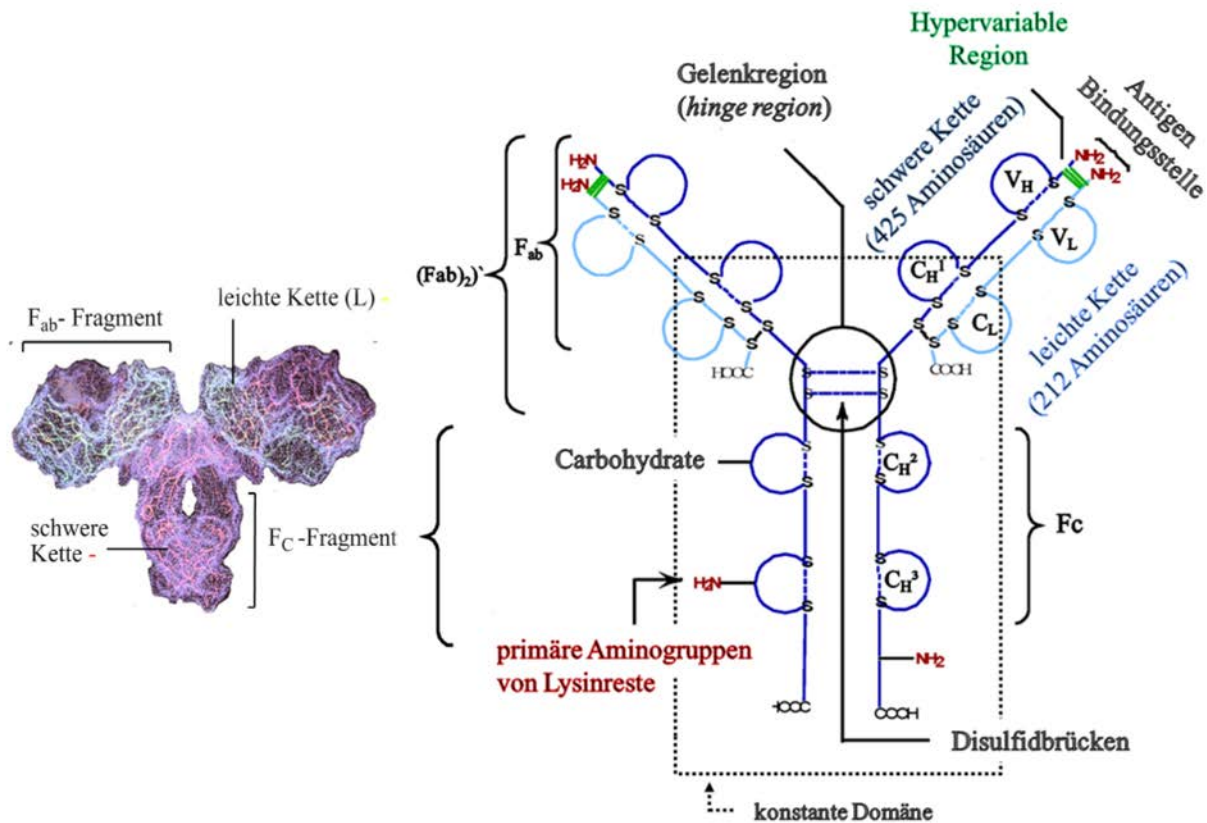


Abbildung 6 Links ist eine Computer simulierte dreidimensionale Struktur eines Antikörpers bzw. Immunglobulins [71] am Beispiel von IgG [72]; rechts ein vereinfachtes Schema gezeigt.

Bei der hypervariablen Region, die in Abbildung 6 grün dargestellt ist, handelt es sich um drei kurze Abschnitte mit signifikanten Aminosäure-Sequenzunterschieden in der variablen Domäne aller Immunglobuline. Diese hypervariable Region der leichten und schweren Kette bildet zusammen die Kontaktstelle für das Antigen. Da Antikörper und Antigen an dieser Stelle komplementär sind, findet man oft auch die Bezeichnung *complementarity determining regions* (CDRs) für die hypervariablen Bereiche. Die hohe Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen beruht auf physikochemischen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, komplementären elektrostatischen Ladungen, hydrophoben Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräften. Die Herstellung von Antikörpern ist, obwohl eine etablierte Technik, zeitaufwendig und erfordert eine hohe fachliche Expertise. Meist

werden hierfür Mäuse oder Kaninchen mit dem Antigen der Wahl immunisiert. Aus ihrem Blut respektive Serum können später die Antikörper aufgereinigt werden.

2.3 Modifikationsstellen von Antikörpern

Antikörper finden in der klinischen Diagnostik und wissenschaftlichen Forschung breite Anwendung. Dabei können Antikörper unmodifiziert oder nach einer auf die Anwendung und Detektionstechnik angepassten Modifikation (z.B. durch Kopplung eines Fluorophors) eingesetzt werden. So basieren die meisten immunologischen Nachweismethoden auf den Nachweis von markierten Antikörpern. Um die kovalente Markierung von Antikörpern, oder auch anderen Proteinen zu gewährleisten, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Reagenzien entwickelt.

Die am häufigsten eingesetzten Markierungsreagenzien um Antikörper-Antigen-Bindungen in Western Blots, oder in immunhistochemischen Anwendungen von biologischen Proben nachzuweisen, basieren auf Enzymen, Fluorophoren und radioaktiven Isotopen. Durch die kovalente Markierung von Antikörpern kann die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung durch direkte oder indirekte Methoden sensitiv detektiert werden. Diese Antikörper-Konjugate stellen damit sehr gute Proben- bzw. Sondenmoleküle dar.

Für die richtige Wahl der Markierungsstrategie ist die strukturelle Aufklärung der Antikörper notwendig, da die Modifikationsstellen abhängig von den freien funktionellen Gruppen des Antikörpers sind. Die drei Hauptmarkierungsstellen sind primäre Aminogruppen, Kohlenhydrat-Einheiten und Sulfhydrylgruppen (siehe Abbildung 6). Am häufigsten werden die primären Aminogruppen (Lysinreste), aufgrund der hohen Anzahl, ihrer leichten Zugänglichkeit auf der Oberfläche, der Antikörpermoleküle und ihrer relativ hohen chemischen Reaktivität, für eine zielgerichtete Markierung gewählt. Durch die hohe Häufigkeit der Amin-spezifischen, aber sonst im Sinne der Antikörperdomänen ungerichteten Markierung, kann es hier zu einer nachteiligen Beeinträchtigung der Antigen-Antikörper-Bindfähigkeit kommen. Eine ungerichtete Mehrfach-Markierung eines Antikörpers [73] kann zu einer gravierenden Beeinträchtigung bzw. vollständigen Überlagerung des Bindungs epitopes durch das Markierungsreagenz führen. Bei der zweiten kommerziellen Markierungsstrategie werden die Kohlenhydrat-Einheiten bzw. die Glykosylierungsstellen in der konstanten C_H2 Domäne des F_C Fragmentes der schweren Kette markiert. Diese Modifikationsstrategie ist sehr anspruchsvoll, es wird durch milde Oxidation eine reaktive

Aldehydgruppe zur Anbindung eines Markers erzeugt. Der Vorteil dieser Modifikationsstrategie liegt hingegen in der Erhaltung des Bindungsepitops, man erhält hoch reaktive Antikörper-Konjugate die für eine spezifische immunologische Detektion von Proteinen eingesetzt werden können. Die dritte Strategie der Antikörpermodifikation, die sogenannte Sulfhydryl-Markierung ist sehr vielversprechend, einfach in der Handhabung und das Bindungsepitop wird ebenfalls nicht beeinträchtigt. Sie erfolgt über mehrere Schritte. Hauptsächlich sollen die Disulfidbrückenbindungen selektiv zu freien Sulfhydrylgruppen (Thiolgruppen) reduziert werden. Die erzeugten reaktiven Sulfhydrylgruppen können dann in einem zweiten Schritt mit unterschiedlichen Reagenzien markiert werden.

2.4 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird in der Biochemie zur Trennung von Proteingemischen nach der apparenten Molekularmasse der Proteine in einem elektrischen Feld herangezogen [74]. Hier wurde eine vertikale SDS-PAGE eingesetzt. Bei diesem System sind die Gele zwischen zwei Glasplatten und dem Puffer vollständig eingeschlossen. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel, [75] bestehend aus zwei verschiedenporigen, übereinandergeschichteten Gelteilen aus Polyacrylamid. Die Diskontinuität bezieht sich auf die unterschiedlichen pH-Werte der Puffer bzw. Gele. Der untere Teil ist das engporige Trenngel mit einem pH von 8,5, wohingegen der obere Teil das weitporige Sammelgel mit einem pH von 6,8 ist (siehe Abbildung 7). Als Laufpuffer wurde ein Tris-Chlorid/Tris-Glycin Gemisch verwendet (siehe Material und Methoden 5.6.2). Proteine können unabhängig von ihrer Größe unterschiedlich geladen sein und liegen meist in unterschiedlichen Faltungen vor (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen). Dies würde die Größenauftrennung stören. Um die Probleme zu umgehen, wird das Proteingemisch mit einem Lämmli-Puffer [76] versetzt und aufgekocht. Dieser Puffer enthält ein Reduktionsmittel und das Detergenz SDS. Durch Erhitzen der Proteine werden ihre Tertiärstrukturen zerstört, indem die Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden. Als Reduktionsmittel wird β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) eingesetzt, um die Disulfidbrücken in den Proteinen zu spalten. Nach der Behandlung liegen alle Proteine denaturiert vor.

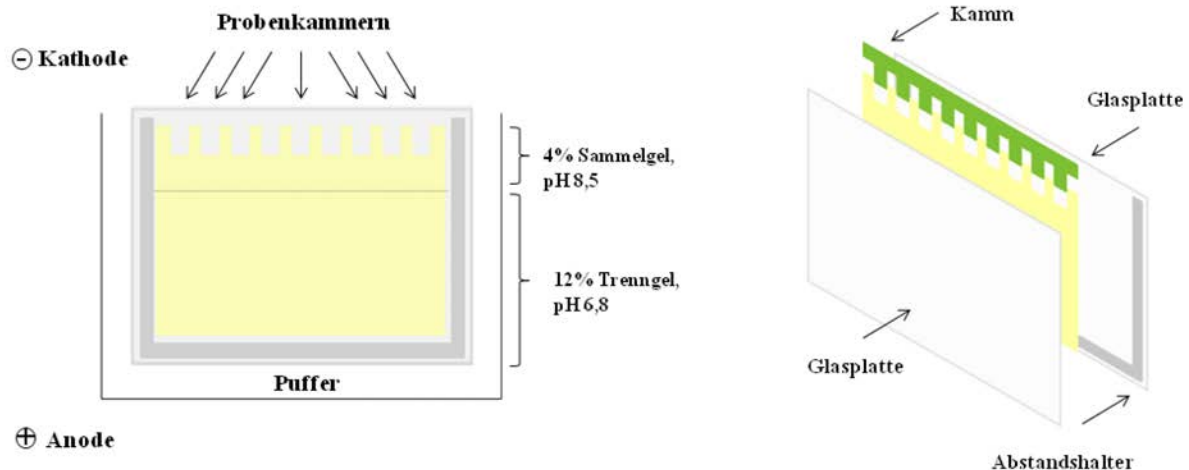


Abbildung 7 Vertikale SDS-PAGE mit schematischem Aufbau der Apparatur (links) und der Gelkassette (rechts).

Das anionische Tensid SDS lagert sich gleichmäßig an die Oberfläche der Proteine an (Ellipsoide Form) und demaskiert die natürliche Eigenladung der Proteine, so dass sie eine negative Nettoladung proportional zur Molekularmasse aufweisen. Die denaturierten Proteinproben werden mit einer Mikropipette in die Geltaschen aufgetragen. Parallel zur Proteinprobe kann ein Molekulargewichtsstandard in eine zweite Geltasche aufgetragen werden. Der Molekulargewichtsstandard besteht aus einem Proteingemisch mit bekannten Molekulargewichten. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (siehe Material und Methoden 5.6.2, Tabelle 23) wird eine Migration der negativ-geladenen Proteine im Gel, in Richtung Anode verursacht. Im weitporigen Sammelgel findet eine Isotachophorese statt. Durch das Zusammenspiel zwischen Laufpuffer, Ionen und des pH-Wertes im weitporigen Sammelgel, wandern die Ionen zunächst mit gleicher Geschwindigkeit, und bilden einen Proteinstapel in Reihenfolge ihrer Mobilität. Das wird als Isotachophorese bezeichnet. Die Kombination verhindert eine Aggregation der Proteine, bewirkt eine hohe Bandenschärfe und erlaubt den Einsatz größerer Probenvolumina. Im Trenngel bewirkt der Siebeffekt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekularmasse. Durch den Einsatz eines Molekulargewichtsstandard kann man das Molekulargewicht der Probeproteine grob abschätzen, da der Logarithmus der Molekularmasse antiproportional zur Laufstrecke ist. Um die Proteinbanden zu visualisieren, kann man das Gel mit Silber [77] oder Coomassie färben [78] (FireSilver, Coomassie, Proteome Factory AG). Die in dem SDS-PAGE befindlichen und nach ihrer apparenten Molekularmasse getrennten Proteine in den einzelnen

Gelspuren werden in einem anschließenden Schritt, mittels Western Blotting aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Dies erfolgt ebenfalls durch das Anlegen eines elektrischen Feldes.

2.5 Western Blotting

Das Western Blot-Verfahren [79, 80], auch Immunoblot genannt, ist eine Methode bei der Proteine auf eine geeignete Trägermembran, wie zum Beispiel Nitrozellulose (NC)- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, übertragen werden. Diese Methode wird von uns als einfaches Modellssystem zur Erprobung der Metall-markierten Antikörper genutzt (siehe Kapitel 2.6, 2.8). Für eine anschließende Detektion mittels LA-ICP-MS ist eine NC-Membran besser geeignet, wie sich in einer Studie von Venkatachalam *et. al.* [81] zeigte.

Nach erfolgter SDS-PAGE Elektrophorese wird ein Senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes, elektrisches Feld angelegt und die Proteine wandern aus dem Gel auf die Membran (siehe Abbildung 7). An der Oberfläche der Membran bleiben die Proteine, aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen haften. Bei diesem relativ schonenden Proteintransfer, bleibt die Immunreaktivität erhalten und nach dem Auswaschen der angelagerten SDS-Ionen, können die Proteine renaturiert werden, also teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder annehmen.

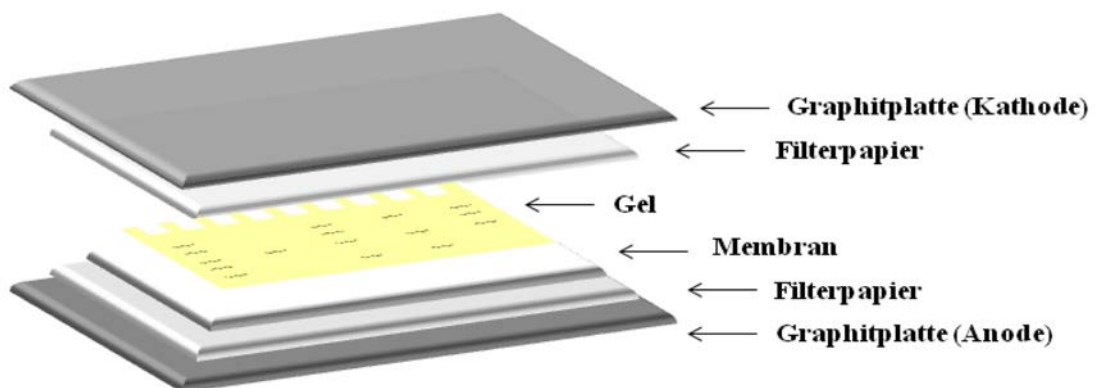


Abbildung 8 Schematischer Aufbau des Semidry-Blottings.

Der Western Blot wird mit zwei unterschiedlichen Systemen durchgeführt, das Tank-Blot-System und das Semidry-Blot-System [82]. Diese unterscheiden sich im Geräteaufbau und der eingesetzten Puffermenge. Für unsere Untersuchung wurde ein Semidry-Blot-System eingesetzt (siehe Abbildung 8, Material und Methoden 5.6.3).

Die Proteinbanden auf der Membran können durch die Bindung von spezifischen Antikörpern (monoklonale oder polyklonale) identifiziert werden. Eine Proteinquantifizierung ist allerdings nicht möglich. Aufgrund der unterschiedlichen Molekularmassen der Proteine kommt es beim Transfer zu Proteinverlusten, da kleine Proteine schneller auf die Membran wandern als große.

Für schnelle Testanalysen werden Dot Blots eingesetzt. Dabei werden Proteine auf eine NC-Membran getropft, mit den modifizierten Antikörpern inkubiert und über die LA-ICP-MS detektiert. Diese Form der Analyse ermöglicht eine Zeitersparnis da keine Proteintrennung sowie Protein-Übertragung notwendig sind.

2.6 Immundetektion

Immunologisch gerichtete Detektionen [83], die durch Antikörper vermittelt werden, finden eine breite Anwendung. Dabei wird die spezifische Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen ausgenutzt. Die kommerziell erhältlichen Standardmarkierungsreagenzien für Antikörper enthalten Enzyme, Fluorophore und radioaktive Isotope (siehe Kapitel 2.7). Bei der Immundetektion müssen zunächst die nach dem Blottingvorgang verbliebenen freien Bindungsstellen auf dem Trägermaterial mit Proteinen aus Milchpulver, Rinderserumalbumin (BSA) oder Gelatine blockiert werden, um eine unspezifische Bindung zwischen dem Trägermaterial und den Antikörpern zu verhindern. Es gibt unterschiedliche Techniken in der Immundetektion, um die spezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigen zu detektieren. Sie verlaufen auf direktem oder indirektem Wege und unterscheiden sich in der Anzahl der Antikörper pro nachzuweisendem Antigen. Bei der richtigen Wahl der Markierungsreagenzien [84] zur Visualisierung der Antikörper-Antigen-Bindung kann die direkte immunologische Nachweismethode zur Multiplex-Analyse eingesetzt werden.

2.6.1 Direkte immunologische Nachweismethode

Bei der direkten Immundetektion kommt ein Antikörpertyp zur Anwendung. Dabei ist der eingesetzte Antigen-spezifische Primärantikörper markiert entweder mit einem Enzym [83, 85, 86], radioaktivem Isotop [87] oder Fluorophor [88] (Abbildung 9). Unter definierten Bedingungen wird der markierte Primärantikörper zu immobilisierten Proteinen gegeben, bindet an sein jeweiliges Antigen und kann direkt detektiert werden (z.B. über Fluoreszenz). Bei der Enzym- und Radioisotopenmarkierung erfolgt die Detektion meist im Einzelnachweis, während die Fluoreszenzmarkierung eine simultane Analyse von maximal sieben Parametern in komplexen Proben ermöglicht, in einem sog. Multiplex-Ansatz [44]. Für die direkte Detektion mit Fluoreszenz-, Enzym- oder Radioisotopenmarkierung wurde ein Multiplex-Ansatz nur in seltenen Fällen genutzt. Da es eine hohe Anzahl an Antigen-spezifischen Primärantikörpern gibt, sowie eine Vielzahl von Markierungsstrategien, ist eine kommerzielle Herstellung von markierten Primärantikörper zu aufwendig und meist unrentabel.

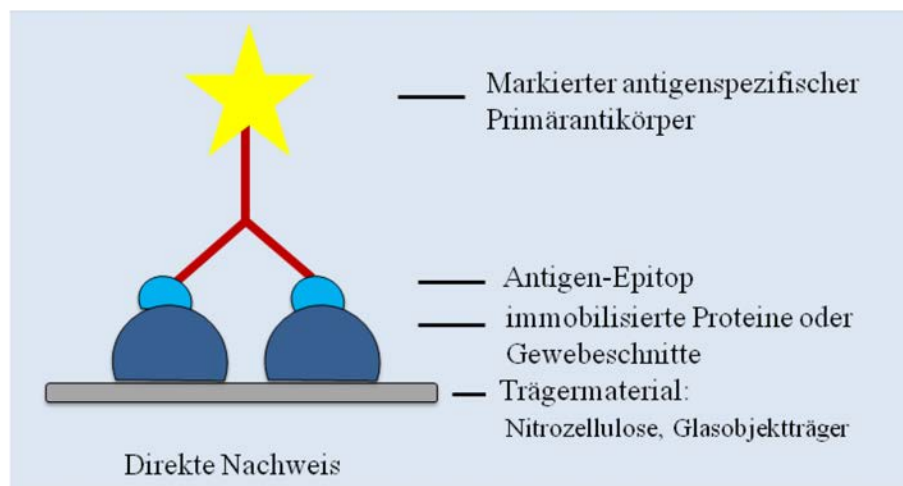


Abbildung 9 Direkte Methode der Immundetektion.

Trotzdem eröffnet die Entwicklung einer einfachen Markierungsstrategie von Primärantikörpern mit Lanthanid Markierungsreagenzien wie MeCAT (siehe Grundlagen 2.8.1, Material und Methoden 5.2.2) ein breites Anwendungsspektrum von Multiplex-Ansätzen, da über den Metallgehalt pro Antikörper eine absolute Quantifizierung der Antigene ermöglicht wird, wenn die Anzahl der pro Antigenmolekül bindenden Antikörper bekannt ist.

2.6.2 Indirekte immunologische Nachweismethode

Die indirekte Detektion ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem der Antigen-spezifische Primärantikörper nicht markiert vorliegt. Dabei erfolgt die indirekte Detektion über den markierten spezies-spezifischen Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil des unmarkierten Primärantikörpers bindet (Abbildung 10). Ein spezies-spezifischer Sekundärantikörper erkennt meist alle Primärantikörper, die von der betreffenden Spezies, wie Maus oder Kaninchen, stammen können. Diese mehrstufige Strategie kann zu einer Empfindlichkeitssteigerung genutzt werden, die durch die Bindung mehrerer markierter Sekundärantikörper je unmarkiertem Primärantikörper erzielt werden kann. Die absolute Anzahl an Markierungen (wie zum Beispiel Enzym-, radioaktive Isotopen- oder Fluoreszenzmolekülen) pro gebundenes Antigenmolekül wird somit gesteigert.

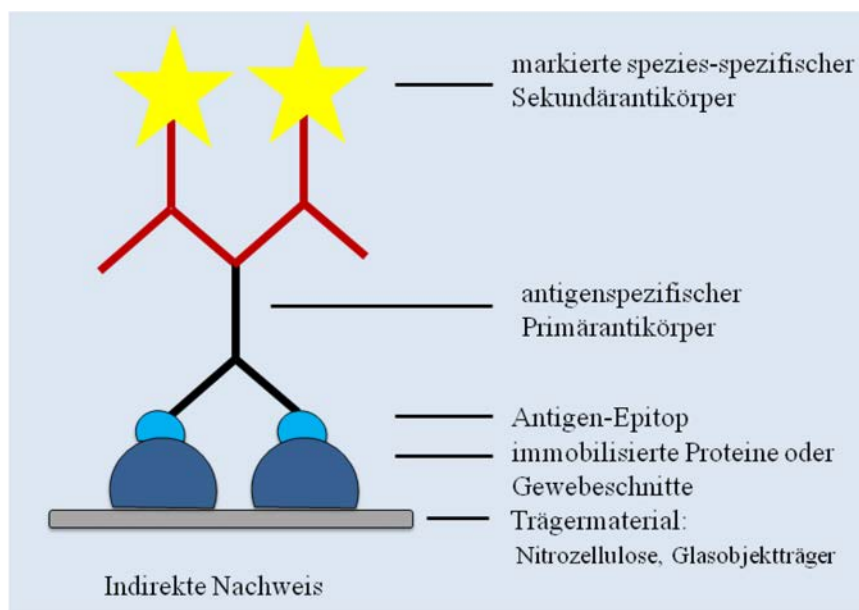


Abbildung 10 Indirekte Methode der Immundetektion.

Die indirekte Immundetektion kann kommerziell eingesetzt werden, da markierte spezies-spezifische Sekundärantikörper in größeren Mengen hergestellt werden können. Die indirekte Detektion kann ausschließlich über einen Einzelnachweis erfolgen, da der modifizierte spezies-spezifischer Sekundärantikörper gegen die Spezies Maus oder Kaninchen des Primärantikörpers gerichtet ist.

2.6.3 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemische Färbung (IHC) [89, 90], auch Antikörperfärbung genannt, ist eine Methode zur Sichtbarmachung von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch an diese binden. Der Nachweis erfolgt über eine indirekte Immundetektion im Einzelnachweis (siehe Kapitel 2.6.2) [83].

In der medizinischen Histologie bzw. im klinisch-diagnostischen Bereich wird die IHC eingesetzt, um krankheitsrelevante Proteine (z.B. in Tumorzellen), in Gewebeschnitten zu identifizieren bzw. zu klassifizieren. Meist werden Formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte, die auf Glasobjektträgern immobilisiert sind, eingesetzt. In dieser Arbeit wurden 5 µm dünne parallel FFPE Gewebeschnitte untersucht. Um die verlorengegangene Immunreaktivität von FFPR Gewebeschnitten für die Antikörper wiederherzustellen, werden unterschiedliche Demaskierungsprotokolle, abhängig vom Antikörper eingesetzt. Für die qualitative Detektion kann nur eine geringe Anzahl an Antikörpern eingesetzt werden, da nicht alle Antikörper an FFPE Gewebeschnitten binden. Für die Routine-Diagnostik sind die zeitaufwendigen IHC-Färbeprotokolle vollautomatisiert, mit einem Probendurchsatz von mehreren hundert Objektträgern am Tag, abhängig vom eingesetzten System. Mit Hilfe der IHC-Färbung können unterschiedliche Proteinniveaus sowie morphologische Veränderungen im Gewebe orts aufgelöst in einem Einzelnachweis mit einem Lichtmikroskop (Mirax Desk, Carl Zeiss) visualisiert werden. Das Lichtmikroskop Mirax Desk hat eine maximale Auflösung von 0,2 µm. Jede Patientenprobe wird für eine histologische Beurteilung der Tumorzellen von einem Pathologen, unter Verwendung eines Mikroskops, visuell bewertet und in Differenzierungsgrade unterteilt. Der Differenzierungsgrad wird in vier Abstufungen unterteilt (0-3) und gibt an, wie stark die Tumorzellen vom gesunden Gewebe abweichen. Der Differenzierungsgrad von 0 wird bei Normalgewebe bzw. gesundem Gewebe vergeben. Je höher der Differenzierungsgrad, desto bösartiger wird der Tumor bewertet. Dies geht mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher.

Die IHC-Färbung wird in der diagnostischen Routine eingesetzt, allerdings bleibt eine laborübergreifende Standardisierung der Färbeprotokolle, sowie Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Quantifizierung eine anspruchsvolle Herausforderung. Vor allem da jeder Biomarker nur in einem Einzelnachweis pro Gewebeschnitt untersucht werden kann und die biologische Varianz der parallelen Gewebeschnitte zu unterschiedlichen Ergebnissen führen

kann. Zusätzlich zeigt die IHC-Färbung einen kleinen dynamischen Detektionsbereich und liefert nur für optimierte Parameter zuverlässige Ergebnisse.

2.6.4 Tissue Micro Array

Um die IHC zu Standardisieren wurden *Tissue Micro Array* (TMA)-Gewebeschnitte [41] entwickelt, um statistisch signifikante Ergebnisse für bis zu 1000 verschiedene Biopsieproben auf einem einzelnen Gewebeschnitt pro Objektträger zu liefern. Die Herstellung der TMA-Gewebeschnitte ist sehr aufwendig und ein TMA-Gewebeschnitt kostet bis zu 10000€.

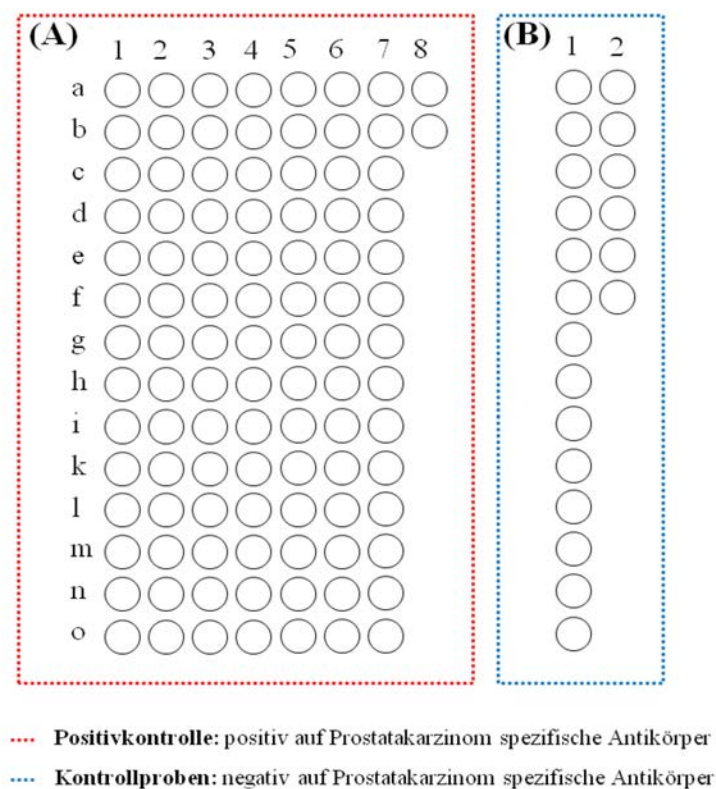


Abbildung 11 Zeigt den Aufbau eines Test-TMA-Gewebeschnittes. (B) Der aus 20 Kontrollbiopsieproben (gesundem Gewebe) und (A) 100 Biopsieproben von Patienten mit hoch abundanten Biomarkern (tumoröses Gewebe) besteht.

Dafür werden Löcher für jede Biopsieprobe in einen leeren Paraffinblock einem sogenannten Empfängerblock, mit einem Durchmesser von 0,6 mm, gebohrt. Anschließend werden definierte Tumorareale aus archivierten Paraffinblöcken mit tumorösen Gewebeproben ausgestanzt. Die ausgestanzten zylindrischen Gewebestücke werden jeweils in die vorgebohrten Löcher des Empfängerblocks eingebracht. Von den TMA-Gewebeblock können

einige 100 Gewebeschnitte angefertigt werden. Für unsere Untersuchungen wurden 5 µm dünne Test-TMA-Gewebeschnitte mit einer Größe von 16 mm x 14 mm eingesetzt (siehe Kapitel 3.6.2, Abbildung 34). Diese bestehen aus 20 Kontrollbiopsieproben (gesundem Gewebe) und 100 Biopsieproben von Patienten mit hoch abundanten Biomarkern (tumoröses Gewebe). In Abbildung 11 ist der Aufbau des Test-TMA-Gewebeschnitt dargestellt. Die 20 Kontrollproben sind im Bereich B, blau umrandet und die 100 Biopsieproben sind im Bereich A, rot umrandet. Nach einer IHC-Färbung sollen die Kontrollbiopsieproben als negativ-Kontrolle dienen und sind nicht, oder nur schwach gefärbt, während die tumorösen Biopsieproben braun bis schwarz gefärbt sind. Das jeweilige Tumorstadium wird von einem Pathologen, unter Verwendung eines Mikroskops visuell bewertet und in Differenzierungsgrade unterteilt (siehe Abschnitt 2.6.3.)

2.7 Antikörpermarkierungen

Es gibt eine Vielzahl von Techniken, die auf den Nachweis von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen basieren [91], wie z.B. *Enzym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) [85], Western Blots und immunhistochemische Anwendungen. Für diese Methoden ist es notwendig, den Antikörper kovalent mit einem Marker zu versehen, der die Detektion und auch die Quantifizierung der Antikörper-Antigen-Bindung ermöglicht. Die am häufigsten eingesetzten Marker sind Enzyme, Fluorophore und radioaktive Isotope.

2.7.1 Enzyme-Marker

Die etabliertesten Markerenzyme sind Peroxidase und die Alkalische Phosphatase (AP) [92]. In beiden Fällen erfolgt die Detektion und Quantifizierung der Enzym-Antikörper-Konjugate indirekt über deren Enzymaktivität, die die Umsetzung zu farbigen oder fluoreszierenden Substraten katalysieren. Diese genannten Enzyme eignen sich hervorragend als Markerreagenzien, da sie aufgereinigt in großer Menge erhältlich sind und über eine hohe spezifische Aktivität für gut detektierbare Substrate verfügen. Derartige Enzym-konjugierte Detektionsantikörper sind ohne nennenswerten Aktivitätsverlust leicht zu synthetisieren und lange haltbar. In der vorliegenden Dissertation wurde mit der AP vermittelten Detektion gearbeitet. Die AP ist ein homodimeres Enzym mit einer Molekularmasse von ca. 140 kDa.

Dieses Enzym hydrolysiert Phosphorsäureester zu Phosphat und Alkohol. Unter schwach alkalischen Bedingungen dephosphoryliert es eine Vielzahl von Molekülen wie Proteine, Nukleotide und Alkaloide. Die Kopplung des Enzyms an den sekundären Antikörper kann in einem Einschnittverfahren oder in einem Zweitschrittverfahren erfolgen [83]. Für die kovalente Kopplung wird Glutardialdehyd, ein homobifunktionales Reagenz eingesetzt, das mit den freien Aminogruppen des Antikörpers und den terminalen Aminogruppen des Enzyms reagiert und diese quervernetzt. Glutardialdehyd wird verwendet da es sehr reaktiv ist und um die mechanische und thermische Stabilität des Enzyms zu steigern. Die Farbreaktion des Enzym-Antikörper-Konjugates verläuft über eine enzymatische Dephosphorylierung, das freigewordene Substrat reagiert mit einem Diazoniumsalz zu einer intensiven roten Azoverbindung. Die Enzym-Markierung wird hauptsächlich zur indirekten Immundetektion eingesetzt. Die Detektion von enzymmarkierten Antikörpern erfolgt ohne hohen apparativen Aufwand und ist eine weitverbreitete Technik, nicht zuletzt weil die spezies-spezifischen Sekundärantikörper-Konjugate preiswert im Handel erhältlich sind und für die Detektion aller primären Antikörper einer Spezies (z.B. vom Huhn) eingesetzt werden können. Zusätzlich sind die AP-Antikörper-Konjugate relativ stabil und damit lange haltbar. Die Detektion zweier unterschiedlicher Antigene ist möglich, unter der Voraussetzung, dass die spezies-spezifischen Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Enzymen markiert sind und zu unterschiedlichen Antikörperspezies gehören. Trotzdem würde die Detektion nicht simultan verlaufen sondern nacheinander. Die beschriebene Methode erlaubt keine quantitative Detektion, da die Aktivität der einzelnen Enzymmoleküle aufgrund ihrer verschiedenen Kopplung eine hohe Heterogenität aufweist. Ihre Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,01 pg/μL [93].

2.7.2 Fluorochrome-Marker

Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung werden auch Fluoreszenzfarbstoffe wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat, Phycoerythrin und Cyan-Farbstoffe, oder auch eine Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt. Fluoreszenzfarbstoffe werden mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, anschließend emittieren sie Licht mit größerer Wellenlänge und geringer Energie. Ihr Absorptions- und Emissionsverhalten ist vom pH-Wert abhängig. Die Kopplung von kleinen Fluoreszenzfarbstoffmolekülen an Antikörper ist relativ

einfach durchzuführen. Die Kopplung des Farbstoffs erfolgt hauptsächlich an den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste. Durch den Zusatz von BSA und Natriumazid ist der fluoreszenzmarkierte Antikörper für einige Monate haltbar. Mit der Fluoreszenz-Markierung ist sowohl eine direkte, als auch eine indirekte Immundetektion möglich.

Durch den Einsatz von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist eine simultane Detektion von bis zu sieben [44] Antigenen unter hohem apparativen Aufwand, mit Hilfe von mathematischer Einzelwertzerlegung möglich. Die Analyse von mehreren Parametern erfordert eine steigende Anzahl an Fluorophoren als potentielle Marker ohne spektrale Überlappungen der Farben und signifikanten Signalintensitäten. Die Nachweisgrenze von Fluorochrom-markierten Antikörpern liegt bei 5 ng/ μ L [94].

2.7.3 Radioaktive Isotopen-Marker

In einigen immunologischen Verfahren werden radioaktive Isotope als Marker eingesetzt. Die Detektion und Quantifizierung der Antikörper-Antigen-Bindung erfolgt durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm. Das radioaktive Isotop ^{125}I (γ -Strahler) hat eine mittlere Halbwertszeit von ca. 60 Tagen und weist damit noch eine ausreichend hohe spezifische Radioaktivität auf. Deshalb wird dieses Isotop in der immunologischen Forschung am häufigsten als Marker eingesetzt. Die Kopplung des radioaktiven Isotops kann direkt an den freien Tyrosinresten unter oxidativen Bedingungen (Chloramin T) erfolgen [87]. In der Biochemie wird eine enzymkatalysierte Reaktion verwendet, die leichter anwendbar und besser kontrollierbar ist. Das ^{125}I - Radioisotop wird dabei sanft in das Protein eingebaut und kann über die Enzym- und Substratmenge kontrolliert werden. Die Isotopenmarkierung wird hauptsächlich für die direkte Immundetektion eingesetzt. Es ist nicht möglich mehrere Antigene simultan oder nacheinander auf einem *Western Blot* zu detektieren. Für diese Markierungsstrategie wird ein sehr kostenaufwendiges Isotopenlabor, mit entsprechender Abfallentsorgung und geschultem Personal benötigt. Die Nachweisgrenze von radioaktiv markierten Antikörpern liegt bei 55 pg/ μ L [95].

2.8 Neue Modifikationsstrategie von Antikörpern

Im Rahmen eines Technologie-Transfer-Projektes mit der Proteome Factory AG sollen neue Verfahren für die Multiplex-Detektion und Quantifizierung von Biomolekülen mittels der Verwendung von Metall-markierten Antikörpern und deren Detektion durch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma (ICP-MS) entwickelt werden. Es sollen Multiplex-Kits mit Metall-markierten Antikörpern zur Detektion von krankheitsrelevanten Biomarkern zur Diagnose von Krebs und zur Entwicklung neuer Medikamente wie z.B. für Morbus Parkinson entstehen, die in Western Blots und Gewebeschnitten Anwendung finden können.

Die Anwendung von Metall-markierten Antikörpern als Multiplexverfahren konnte bereits von Waentig *et al.* gezeigt werden. Sie entwickelte eine Markierungsstrategie für primäre Antikörper mit einem Lanthanid beladenen p-SCN-Bn-DOTA-Komplex (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecan-1, 4, 7, 10-tetra-essigsäure) [49, 50] für die Untersuchung von chemisch induzierter Expression von Cytochrom-P450 (CYP) in einem 5-fach Multiplex Western Blot Immunoassay. In den Vorarbeiten von Waentig konnten Nachweisgrenzen im pmol bis fmol Bereich für die CYP erzielt werden. Diese Markierungsstrategie wurde von Giesen *et al.* genutzt, um drei Krebsmarker in hoch exprimierten Brustkrebsgewebeschnitten, mittels LA-ICP-MS mit einer Auflösung von 200 µm nachzuweisen [52]. Zur Steigerung der Empfindlichkeit und Auflösung für die Anwendung von geringer exprimierten Proteinen in Gewebeschnitten oder komplexen Proteinproben werden neue, leistungsfähigere Element-Markierungsreagenzien für die LA-ICP-MS benötigt.

Daher ist die Entwicklung einer LA-ICP-MS basierten multiplexfähigen IHC für Gewebeschnitte der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit. Dazu sollte ein DOTA-Lanthanoid-Marker (MeCAT) ausgewählt werden, welcher sich bereits für die Protein- bzw. Peptidquantifizierung bewährt hat (MeCAT-Kits für Proteine, PM10001). Der Metallkomplex mit Lanthanoiden als Marker soll kovalent an Antikörper gebunden und mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) detektiert werden. Derartige Metallkomplexe können mit unterschiedlichen Lanthanoiden einer Gruppe im Periodensystem beladen werden und ermöglichen so die parallele Detektion bzw. Differenzierung innerhalb eines Gemisches im sog. Multiplex-Ansatz [49, 53, 96]. Anstelle von Fluoreszenzfarbstoffen werden bei dieser Strategie stabile, nicht radioaktive Lanthanidisotope detektiert.

Die Analyse mittels ICP-MS (siehe auch Kapitel 2.1) ermöglicht die Detektion der meisten Elemente des Periodensystems mit einer hohen Analyseempfindlichkeit und ist damit nicht nur für die Detektion von natürlich kovalent gebundenen Heteroelementen [8, 9, 11] in biologischen Proben, sondern auch für die Detektion von kovalent gebundenen Lanthanidreagenzien an Proteinen geeignet [12, 13]. Im Vergleich zu konventionellen Markierungen können mittels Lanthanidelement-Markierung bis zu 32 Parameter [15] gleichzeitig mittels ICP-MS detektiert werden. Die Nutzung von Laserablationssystemen ermöglicht die orts aufgelöste Detektion von Western Blot Membranen und biologischen Proben, wie Gewebeschnitten, in einem multiplexfähigen Verfahren.

2.8.1 Modifikation von Antikörpern mittels MeCAT

Bei der entwickelten Markierungsstrategie [55] handelt es sich um eine zweistufige Reaktion, bei der zunächst die selektive Reduktion mit (Tris(2-carboxyethyl)phosphin · HCl (TCEP) [97, 98] einer, oder mehrer Disulfidbrücken des Antikörpers unter physiologischen Reaktionsbedingungen, ohne Beeinträchtigung des Bindungsepitops, erfolgt. Die Reduktion erfolgt nicht gerichtet gegen eine spezielle Disulfidbrücke, wie zum Beispiel die *Hinge Region* [99]. Als Reduktionsmittel wurde TCEP eingesetzt, da es selektiv Disulfidbrücken reduziert [100]. Ein wichtiger Bestandteil der Reduktion ist Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) [101], sie stabilisiert die reduzierten Antikörperfragmente (Abbildung 12).

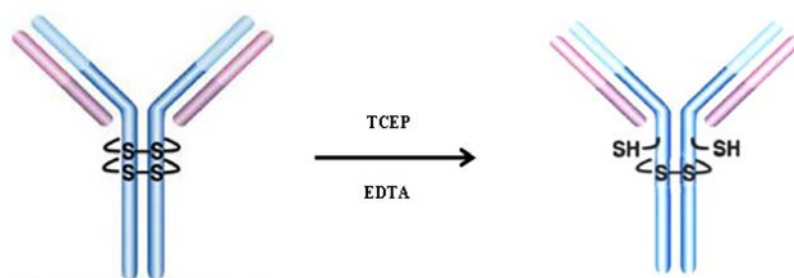


Abbildung 12 Schematische Darstellung der selektiven Reduktion von Antikörpern unter physiologischen Reaktionsbedingungen mit dem Reduktionsmittel (Tris(2-carboxyethyl)phosphin · HCl (TCEP) [102].

Zur Markierung der Antikörperfragmente wurde ein kommerziell erhältlicher DOTA-Maleimid-Linker (MeCAT) eingesetzt [103, 104], ein sogenannter Chelatbildner (DOTA) der

trivalente Metalle (z.B. Lanthanoiden) komplexiert, und an einen Linker gebunden ist. Der Linker kann über seine Doppelbindung in der reaktiven Maleimidgruppe durch nukleophilen Angriff des Schwefelatoms vom Cystein kovalent an den Antikörper gekoppelt werden (Abbildung 13). Der achtzählige DOTA-Chelatkomplex ist in der Lage trivalente Übergangsmetalle bzw. Seltenerdmetalle achtfach zu koordinieren und somit besonders stark zu binden [105].

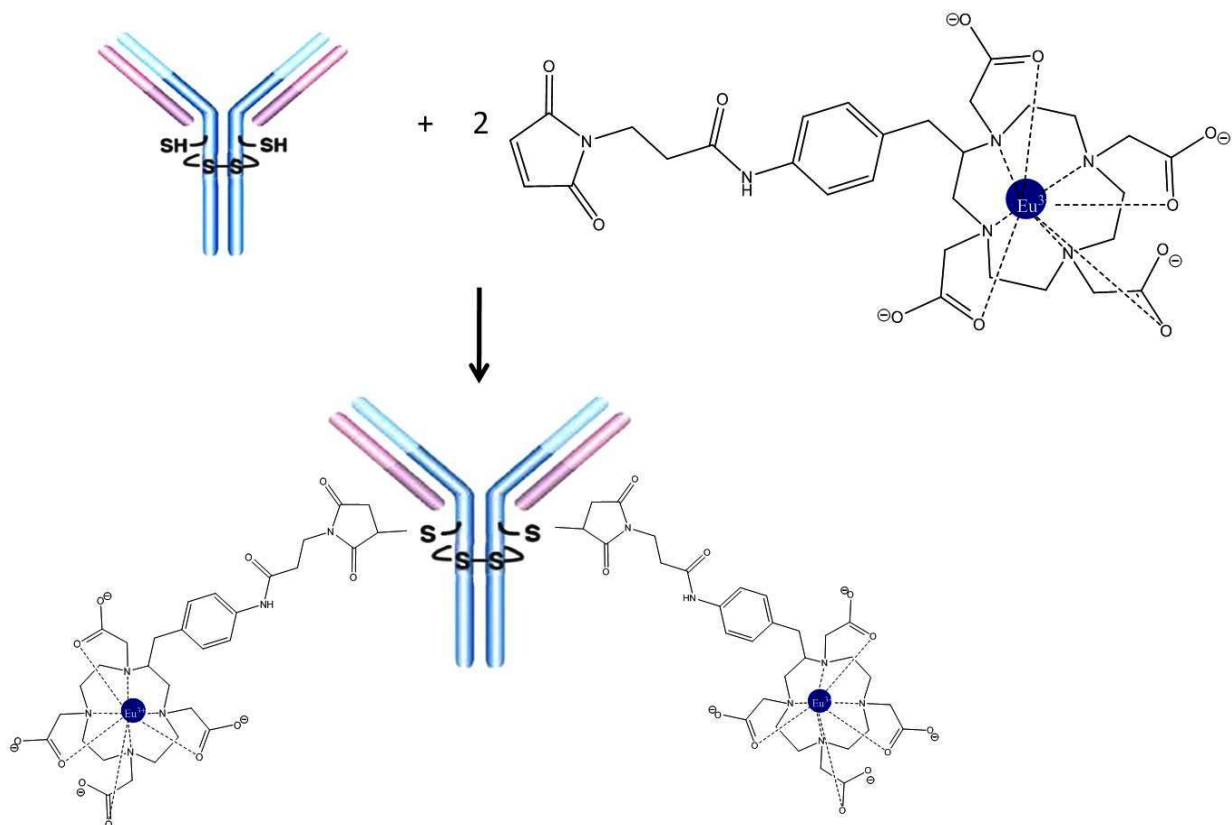


Abbildung 13 Kovalente MeCAT-Markierung von Antikörpern [106].

Die Verwendung von MeCAT-markierten Antikörpern soll den gleichzeitigen Multiplex-Nachweis verschiedener Antigene in einer einzigen Analyse ermöglichen, wobei jeder eingesetzte Antigen-spezifische Antikörper mit einem anderen Lanthanid markiert werden soll. Das Auslesen erfolgt dann durch das bildgebende Verfahren der Laserablation-ICP-MS (LA-ICP-MS), wodurch die verschiedenen Markierungsmetalle und damit verschiedene Antigene parallel, hoch sensitiv auf NC-Membranen oder in Gewebeschnitten orts aufgelöst detektiert und differenziert werden können.

2.9 Anwendung von klinischen Antikörpern

Im Gegensatz zu Arbeiten von Giesen *et al.* [52] sollte eine Markierung der Aminogruppen vermieden werden, da diese auch im Bindungsepitop vorkommen. Durch diese ungerichtete mehrfache Markierung kann das Bindungsepitop vom Markierungsreagenz überlagert und die Antigen-Antikörper Bindungsfähigkeit stark herabgesetzt werden. Deshalb sollte eine neue Markierungsstrategie basierend auf einer kovalenten Modifikation von Thiolgruppen unter physiologischen Reaktionsbedingungen entwickelt werden. Der Schwerpunkt meiner Dissertation ist die Entwicklung der Markierung von Antikörpern mit dem MeCAT-Reagenz und deren Anwendung in der klinischen Diagnostik. Zur Überprüfung des Konzeptes sollten möglichst komplexe, reale Fragestellungen aufgegriffen werden, weshalb diagnostische Antikörper in einem Multiplex-Ansatz, orts aufgelöst in Gewebeschnitten massenspektrometrisch detektiert wurden.

Um einen Vergleich zwischen dem bereits eingesetzten SCN-DOTA (siehe Abschnitt 2.8) und dem neu Erprobtem MeCAT-Markierungsreagenz für die Modifikation von Antikörpern zu erzielen, wurde zunächst ein spezifischer Antikörper für das Mammakarzinom als Modellsystem ausgewählt. Desweiteren wurden zwei unterschiedliche medizinische Fragestellungen untersucht, zum einen der klinisch-diagnostische Nachweis von Prostatakarzinom in Gewebeschnitten und zum anderen wurde das Ausmaß der neurodegenerativen Erkrankung von Morbus Parkinson untersucht, um neue Therapieansätze zu entwickeln. Die klinisch-relevanten Antikörper zur Früherkennung und Klassifizierung von Prostatakarzinomen wurden, in Anlehnung der medizinischen Routine-Diagnostik, von unserem Kooperationspartner dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf ausgewählt. Der Arbeitskreis von Prof. Dr Theuring von der Charité (Institut für Pharmakologie-CCR) wählte die spezifischen Antikörper zur Untersuchung von neurodegenerativen Erkrankungen an Mausgehirngewebeschnitten aus.

Es wurden unterschiedliche Antikörper gegen Haushaltsproteine getestet, da diese eventuell homogen im Gewebeschnitt vorliegen und als Standards bzw. zur Korrektur von Schwankungen des Laserabtrages genutzt werden können.

2.9.1 Mammakarzinom

Die hier eingesetzten spezifischen Antikörper (anti-Her2-Antikörper, anti-MUC1-Antikörper) werden im diagnostischen Bereich regulär für die IHC-Färbung eingesetzt und wurden nach unserem Standardmarkierungsprotokoll mit MeCAT-modifiziert (siehe Material und Methoden/Kapitel 5.6.6.1).

Diese klinisch-relevanten Antikörper wurden zur Untersuchung von Paraffin-eingebetteten Mammakarzinom-Gewebeschnitten für LA-ICP-MS erprobt. Für diese Untersuchung wurden zunächst zwei klinische Antikörper ausgewählt; anti-Her2-Antikörper und anti-Muc1-Antikörper (siehe Abschnitt 2.9.1.1 und 2.9.1.2). Später wurde die Anwendung der Modifikationsstrategie auf Multiplex-Ansätze ausgeweitet.

2.9.1.1 Anti-Her2-Antikörper

Der polyklonale Kaninchen anti-Human c-erbB-2 Onkoprotein-Antikörper mit dem Synonym Her2 (Rezeptor für humane Wachstumsfaktoren) [107] wird in der Diagnostik zur Identifikation von c-erbB-2-Onkoproteins im Mammakarzinom via IHC-Färbung detektiert. Der Antikörper wird in der IHC-Färbung von Gewebe zur Nachsorge und Verlaufskontrolle von Brustkrebs herangezogen. Das c-erbB-2-Protein gehört zu der EGF-Rezeptor-Familie (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) und wird im normalen Gewebe in den Epithelzellen mit geringer Konzentration exprimiert. Der Anteil der Patienten mit Brustkrebs, bei denen der Her2- sowie der Mucine-Marker positiv getestet wird, liegt bei 60 bis 80% und bei metastasierten Brustkrebs sogar bei 90% [108]. Im Rahmen dieser Studie soll der Antikörper nicht nur für Mammakarzinom-Gewebeproben eingesetzt werden, sondern soll auch für Prostatakarzinom-Gewebeproben, als sogenannte negativ-Kontrolle dienen (siehe auch Kapitel 2.9).

2.9.1.2 Anti-MUC1-Antikörper

Mucine (MUC1) sind Glykoproteine, die auf vielen Adenokarzinomen [109], wie unter anderem Prostatakrebs [110] oder auch Brustkrebs, überexprimiert werden. MUC1 wird in der klinischen Diagnostik mittels IHC-Färbung als Tumormarker, zur Nachsorge und Verlaufskontrolle von Brustkrebs herangezogen. Die Patienten mit Brustkrebs, bei denen der Marker positiv getestet wird, liegt bei 60 bis 80% und bei metastasierten Brustkrebs sogar bei 90% [108, 110].

Der monoklonale Maus anti-MUC1-Antikörper wird für die klinische Diagnostik von Prostatakarzinomen bisher nicht verwendet. MUC1 könnte aber möglicherweise auch ein potentieller Tumormarker für Prostatakrebs werden.

2.9.2 Prostatakarzinom

Die folgenden Antikörper wurden ausgewählt, da sie regulär im diagnostischen Bereich zur Früherkennung und Klassifizierung von Adenokarzinomen der Prostata eingesetzt werden. Die Antikörper wurden in einem Multiplex-Ansatz an einem *Tissue Micro Array* (TMA) vom Prostatakarzinom (siehe Abschnitt 2.6.3) eingesetzt und erprobt. In der klinischen Untersuchung werden TMA-Gewebeschnitte eingesetzt, um die IHC-Färbung für eine hohe Anzahl von Biopsieproben vergleichbar zu machen [41].

2.9.2.1 Anti-AMACR

Der anti-AMACR (Alpha-Methylacyl-Coenzym-A-Racemase, Synonym P405S)-Antikörper dient zur Erkennung und Klassifizierung von Adenokarzinomen der Prostata [111, 112, 113, 114, 115, 116, 117]. Der monoklonale Kaninchen anti-AMACR-Antikörper bindet spezifisch an die humane Alpha-Methylacyl-Coenzym-A-Racemase (AMACR, Synonym P504S) [118, 119]. Dieses Enzym spielt bei der Biosynthese von Gallensäuren und β -Oxidation von verzweigten Fettsäuren eine Rolle [119] und wird in der Frühform einer bösartigen Veränderung der Schleimhaut und in Adenokarzinomen der Prostata verstärkt exprimiert. Desweiteren ist das Enzym auch in gesunder Prostata in geringer, bis nicht mehr per IHC-Färbung nachweisbarer Konzentration, vorhanden [118].

2.9.2.2 Anti-PSMA-Antikörper

Das Prostata-spezifische Membran Antigen (PSMA), ein Membranprotein Typ II, wird sowohl in gesundem als auch in malignem prostaticem Epithel exprimiert [120, 121, 122, 123]. PSMA hat die Funktion einer Neuro-Carboxy-Peptidase, sowie einer Folat-Hydrolase. Es wird angenommen, dass das Enzym das Prostatawachstum reguliert und in die Zelldifferenzierung involviert ist [124]. Der monoklonale Maus anti-PSMA-Antikörper wird in der Diagnostik zur Erkennung und Klassifizierung von Adenokarzinomen der Prostata eingesetzt [120, 121, 122, 123, 124, 125]. Es ist erwiesen, dass die IHC Detektion der PSMA-Expression mit dem Krankheitsverlauf korreliert.

2.9.2.3 Anti-Erg-Antikörper

Der monoklonale Kaninchen anti-Human Erg-Antikörper wird in der IHC von Prostata-Gewebeschnitten zur Erkennung von Adenokarzinomen der Prostata eingesetzt [126, 127]. Die Überexpression des Proteins wird mit Prostatakrebs assoziiert. Das Protein Erg fungiert als ein DNA-bindender, transkriptionaler Regulator und gehört zu der Erythroblastentransformationsspezifischen (ETS) Familie von Transkriptionsfaktoren [128]. Die Erg-Expression spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Zellproliferation (Zellwachstum), Apoptose (kontrollierter, gesteuerter Zelltod) und Gewebe-Remodellierung. Die Deregulierung von ETS-Genen führt zu einer malignen Transformation von Zellen [128].

2.9.2.4 Anti-Androgenrezeptor-Antikörper

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zu der Familie von hormoninduzierten Transkriptionsfaktoren [129, 130]. Der Rezeptor wird durch die Bildung der androgenen Steroidhormone z.B. Testosteron oder Dihydrotestosteron aktiviert, so dass es zu einer Regulierung und Modellierung einer spezifischen Gentranskription kommt, die zur Aktivierung von Zellwachstum führt. Die Überexpression des Proteins wird mit Prostatakrebs assoziiert [131, 132, 133]. Der monoklonale Maus anti-Androgenrezeptor-Antikörper wird in der IHC zur Erkennung von Adenokarzinomen eingesetzt [134].

2.9.3 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die durch das Absterben der Dopamin-produzierenden Nervenzellen in der *Substantia nigra* (Struktur im Mittelhirn) verursacht wird [135]. Die Ursache der Parkinson-Krankheit ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Mutation im Synuclein Gen ist für die Bildung von alpha-Synuclein-haltigen, unlöslichen intrazellulären Proteinaggregaten, in Form von Lewy-Körpern (charakteristische Strukturen im Gehirngewebe von Parkinson-Erkrankten) und Nervenzellen im zentralen Nervensystem verantwortlich und wird für die pathologische Charakterisierung von Morbus Parkinson herangezogen.

Das alpha-Synuclein ist ein kleines Protein das die Dopamin Ausschüttung reguliert. Dopamin ist ein biochemischer Botenstoff, der Signale von einer Nervenzelle zu einer anderen Nervenzelle oder Zelle weiterleitet, bzw. verstärkt oder reguliert. Der Mangel an dem Botenstoff führt zu einer Funktionsstörung, bzw. Verminderung der Basalganglien im Großhirn (beidseitige Kerne, in jeder Hirnhälfte unterhalb der Großhirnrinde), so dass es zu einer Protein-Expression oder Verminderung in den Teilbereichen des Gehirns kommt. Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle und werden als Biomarker, bzw. als Indikator für das Krankheitsstadium eingesetzt. Um Morbus Parkinson zu untersuchen, werden transgene Mausmodelle eingesetzt, die das menschliche Synuclein-Gen überexprimieren, so dass es zur Bildung von Lewy- Körpern im Gehirn und Nervenzellen im Rückenmark kommt [136, 137, 138]. Die Lewy-Körperchen bestehen überwiegend aus Synuclein, einem natürlichen, aber in seiner räumlichen Struktur krankhaft veränderten Protein [139]. Diese genetische-Modifikation an Tiermodellen kann einen direkten Einfluss auf die Konzentration, unterschiedlicher Proteinmengen im Mausgehirn, oder durch Transkriptionsfaktoren einen indirekten Einfluss auf verschiedene Proteinkaskaden haben. Die veränderte Regulation von verschiedenen Proteinen, verursacht durch genetische-Modifikationen, ermöglicht die Identifizierung und Aufklärung von neuen Faktoren bzw. Mechanismen, sowie die Entwicklung von neuen Behandlungsansätzen und neuen Medikamenten.

Um den Einfluss der genetischen-Modifikation zu beurteilen, werden stets nicht genetisch-modifizierte Maustypen als Kontrolle mitgeführt. Daher sind die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeschnitte in zwei Klassen gegliedert. Es gibt den sogenannten Wildtyp Maus (wt), die nicht modifizierte Referenz und der genetisch veränderte Homotyp Maus (ho).

2.9.3.1 Anti- α -Synuclein-Antikörper

Das α -Synuclein wurde als ein Bestandteil der Parkinson-Krankheit assoziierten Amyloid-Plaques identifiziert [140]. Eine mutierte Form des α -Synuclein wurde bei Patienten mit frühem Beginn der Parkinson-Krankheit gefunden. Die Multiplikation des α -Synuclein-Gens wird mit der Parkinson-Krankheit assoziiert [136, 141, 142, 143].

2.9.3.2 Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper

Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein Enzym, das bei der Adrenalin-Synthese die Umwandlung von Tyrosin zu Levodopa (L-DOPA) katalysiert. Seine Aktivität stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt in der Biosynthese von Dopamin dar [144]. Die Pathogenese der Parkinson-Krankheit wird mit der verminderten Produktion an Dopamin, durch das Fehlen der Tyrosinhydroxylase, assoziiert.

2.9.3.3 Anti-Gliafaserprotein-Antikörper

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein Intermediärfilamentprotein und ein spezifischer Marker für Gliazellen [145] bzw. Immunzellen im Hippocampus. Eine starke GFAP-Expression findet man bei akuten Infektionen des Nervensystems und bei neurodegenerativen Erkrankungen.

2.9.3.4 Anti- Neuronenspezifische Kernprotein-Antikörper

Der anti-Neuronenspezifische Kernprotein (NeuN)-Antikörper reagiert mit den meisten neuronalen Zelltypen im gesamten Nervensystem [146, 147, 148, 149]. Eine verminderte Anzahl an Nervenzellen wird mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert.

2.9.4 Haushaltsproteine

Als Haushaltsproteine werden Proteine bezeichnet, die an essentiellen Zellfunktionen beteiligt sind und somit eventuell homogen im Gewebe verteilt sind. Diese homogene Verteilung könnte für die Kompensation von Gewebeschichtdicken eingesetzt werden. Ob und welche Proteine homogen im Gewebe verteilt sind und als interner Standard für den Laserabtrag der Gewebeschnitte eingesetzt werden können, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

2.9.4.1 Anti- β -Aktin-Antikörper

Aktin ist ein Strukturprotein, das sich als Haushaltsprotein [150] bewährt hat. Dieses Protein gehört zum charakteristischen Proteinanteil von allen eukaryotischen Zellen [151] und wird kontinuierlich, unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium oder anderen äußeren Einflüssen, exprimiert. Aktin ist eines der häufigsten Proteine in Eukaryoten und ist ein Bestandteil des Zytoskeletts [152].

2.9.4.2 Anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Antikörper

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein essentielles Schlüsselenzym der Glykolyse und gehört ebenfalls zu den sogenannten Haushaltsproteinen [153]. Dieses Enzym katalysiert in allen Eukaryoten den zentralen Prozess beim Abbau von Kohlenhydraten in Energie und moduliert die Anordnung und die Zusammensetzung des Zytoskeletts [154].

2.9.4.3 Anti-OxcT1-Antikörper

Die 3-Ketosäure-CoA-Transferasen sind Enzyme, die das Coenzym A von Succinyl-Coenzym A auf γ -Ketosäuren übertragen [155]. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt im Abbau von Ketokörpern. Dieses Enzym soll in diesen Versuchen als sogenanntes Haushaltsprotein für Organellen erprobt werden. Das Enzym ist in hohem Maß in Herz, Nieren, Gehirn und Muskeln nachweisbar.

2.9.5 Phosphorylierung

Der anti-Phosphoserin-Antikörper wurde zur Untersuchung einer erhöhten Phosphorylierung von Biomarkern im Mausgehirngewebeschnitt zur Charakterisierung von Morbus Parkinson herangezogen.

2.9.5.1 Anti-Phosphoserin-Antikörper

Eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Proteinaktivitäten spielen Phosphorylierungsreaktionen. Änderungen des Phosphorylierungsgrades werden mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei ist Serin die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure. Das Verhältnis der Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin liegt bei 1800:200:1. Bei der Morbus Parkinson-Erkrankung soll die Phosphorylierung von Serin 129 des alpha-Synuclein eine entscheidende Rolle spielen [156, 157] und wurde daher als neuer Biomarker erprobt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Prinzip der Markierungs- und Detektionsstrategie

Das Ziel dieser Dissertation ist die Anwendung der multiplexfähigen LA-ICP-MS Detektion im medizinisch-diagnostischen Bereich zur Analyse von Metall-markierten Antikörpern und deren Anwendung in Gewebeschnitten von Tiermodelluntersuchungen bzw. Patientenproben. Da Antikörper bei der Metall-Markierung ihre Spezifität einbüßen können, wurde zur Optimierung und Kontrolle auf Standard-Workflows der Proteinchemie, wie die Gel-Elektrophorese und den Western Blot, modellhaft zurückgegriffen. An diesem Modell wurden deshalb auch zuerst Konzepte zur Standardisierung und zur Quantifizierung erprobt, bevor sie für komplexe Gewebeproben eingesetzt wurden.

Für die hier verwendete Kopplung eines kommerziellen Laserablations-Systemes mit einem ICP-MS Gerät wurden, für die Detektion von Markierungsmetallen, die instrumentellen Parameter täglich optimiert (siehe Grundlagen 2.1.3 und Material und Methoden 5.1.2). Um die Proben vollständig zu detektieren wurden mehrere Linienscans mit einer Überlappung von ca. 15-20 μm aneinandergereiht (siehe Abbildung 3). Für die Auswertung wurden die einzelnen Linienscans der jeweiligen Lanthanidelemente zusammengefasst und in 2D Intensitätsprofile umgewandelt. Eine detaillierte Beschreibung zur Generierung der 2D Intensitätsprofile ist in dem Kapitel 2.1.3 (siehe Abbildung 4(A, B)) beschrieben.

Bezüglich der anzuwendenden Markierungsstrategie soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass Vorarbeiten zur Metall-Markierung von Antikörpern in den Arbeiten von Wäntig und Giesen bereits vorgelegen haben, und das es Ziel dieser Arbeit war, Methoden basierend auf MeCAT-Reagenzien im Rahmen eines geförderten Projektes zu entwickeln und zu optimieren.

In diesem Kapitel werden die biochemischen Arbeitsabläufe schematisch dargestellt, um die Markierungsstrategie von Antikörpern und deren Anwendung in der LA-ICP-MS Detektion zu optimieren (siehe Abbildung 14). Diese Strategie zeichnet sich dadurch aus, dass Proteine hochspezifisch immunologisch binden, das heißt über eine Metall-Antikörper-Antigen Konjugation und über das kovalent gebundene Metall, via LA-ICP-MS Detektion, hoch empfindlich nachgewiesen werden können. Durch die charakteristisch, eingebrachten Metallheteroatome können die Konjugate der multiplexfähigen LA-ICP-MS Detektion zugänglich gemacht werden (siehe Kapitel 2.1.3). Um die hohe charakteristische Spezifität

einer immunologischen Reaktion zu erhalten, verläuft die zweistufige Markierungsreaktion von Antikörpern unter physiologischen Reaktionsbedingungen (siehe Abbildung 14 (A), Grundlagen 2.8.1).

Zunächst wurde die selektive Teilreduktion mit dem Reduktionsmittel TCEP untersucht. Dafür wurden die teilreduzierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, um an Hand der Lage der Proteinbanden die Stärke der Reduktion abschätzen zu können (siehe Abbildung 14 (A-1), Grundlagen 2.4, Ergebnis und Diskussion 3.2.1).

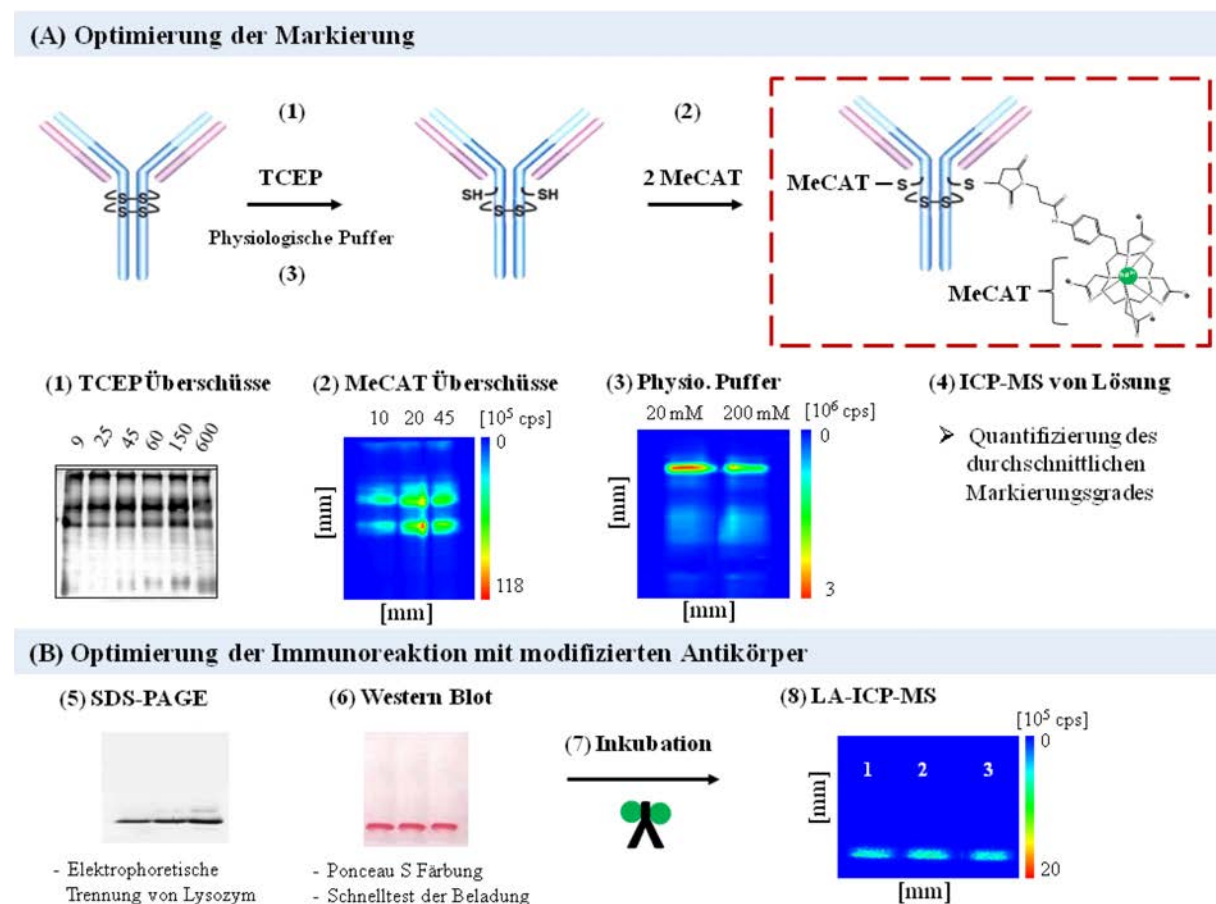


Abbildung 14 Schematische Darstellung der biochemischen Arbeitsabläufe um die Antikörper-Antigen-Konjugate für die LA-ICP-MS zugänglich zu machen.

In einem weiteren Schritt wurde das molare MeCAT-Verhältnis zum Antikörper bestimmt. Dafür wurde der am stärksten teilreduzierte Antikörper eingesetzt, um eine hohe Anzahl an MeCAT Molekülen pro Antikörper mit hohen Signalintensitäten, sowie Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) für die LA-ICP-MS Detektion zu generieren. Die unterschiedlich stark modifizierten Antikörper wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf

eine NC-Membran übertragen (siehe Grundlagen 2.5). Anschließend erfolgte die Detektion mittels LA-ICP-MS auf dem ausgewählten Isotop (siehe Abbildung 14 (A)-2), Ergebniss und Diskussion 3.2.2). Um die Spezifität der modifizierten Antikörper durch die Markierung nicht herrabzusetzten wurden die physiologischen Reaktionsbedingungen optimiert, indem die Markierungsreaktion unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Puffern untersucht wurden. Zu diesem Zweck wurden die modifizierten Antikörper mittels LA-ICP-MS detektiert, um die höchsten Signalintensitäten mit den besten SNRs zu bestimmen (siehe Abbildung 14 (A-3). Zusätzlich wurde die Anzahl der MeCAT-Moleküle pro Antikörper in Lösung und die Reproduzierbarkeit der Markierung mittels ICP-MS bestimmt (siehe Abbildung 14 (A-4), Grundlagen 2.1.2.1).

Nach Optimierung der zweistufigen Markierungsreaktion wurde die Spezifität der modifizierten Antikörper für die bildgebende LA-ICP-MS Detektion überprüft. Dafür wurden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine NC-Membran übertragen. Anschließend wurde die NC-Membran mit den modifizierten Antikörpern inkubiert und mittels LA-ICP-MS gemessen.

3.2 Optimierung der Markierungsstrategie für die LA-ICP-MS

3.2.1 Selektive Reduktion

Die Optimierung der selektiven Teilreduktion erfolgte an einem polyklonalen Standardantikörper: dem anti-Lysozym-Antikörper (vom Kaninchen). Als Reduktionsmittel wurde Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) eingesetzt, da es selektiv Disulfidbrücken reduziert [100]. Die Reaktion muss unter physiologischen Reaktionsbedingungen ablaufen, damit die Reaktivität und Selektivität des Antikörpers nicht beeinträchtigt wird. Zur Ermittlung des optimalen Konzentrationsverhältnisses zwischen Antikörper und Reduktionsmittel wurde die Konzentration des Antikörpers (6,67 pmol/ μ L, 666,67 pmol) konstant gehalten und die Konzentration des Reduktionsmittels variiert. Das gezeigte Konzentrationsverhältnis von Antikörper zu Reduktionsmittel betrug initial 1:9 und wurde bis zu einem 1125-fachen molaren Überschuss an TCEP untersucht. Das entspricht einem Konzentrationsbereich an TCEP von 60 pmol/ μ L (6 nmol) bis 7500 pmol/ μ L (400 nmol). Um die Spezifität des Antikörpers nicht zu beeinträchtigen, wurden drei unterschiedliche physiologische Puffer zur Optimierung der selektiven Reduktion erprobt

(siehe Abschnitt 5.2.1). Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedlich konzentrierte Tris Puffer (200 mM Tris (150 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 7,4), 20 mM Tris (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA, pH 7,4) und ein Phosphat Puffer (100 mM Phosphat (2,5 mM EDTA, pH 7,2) eingesetzt. Laut Herstellerangaben (Thermo Scientific) soll TCEP · HCL in PBS Puffer bei neutralem pH-Wert nicht stabil [97] sein. Daher ist eine signifikant schwächere Teilreduktion des Antikörpers zu erwarten. Die elektrophoretische Auftrennung der reduzierten Proteine erfolgte in einer 12%igen SDS-PAGE. Zur Kontrolle des Proteinmarkers wurde zusätzlich BSA auf das Gel aufgetragen. Nach der Silberfärbung des Gels konnte erwartungsgemäß für BSA eine Proteinbande bei 66 kDa mit Übereinstimmung des farbigen Proteinstandards detektiert werden. Des Weiteren wurde der native Antikörper mit einer Molekularmasse von 150 kDa als Referenz aufgetragen. Das Proteinmuster des unbehandelten Antikörpers zeigte eine ungewöhnlich hohe Hauptproteinbande bei 251 kDa und weitere Proteinbanden bei 66 kDa, 61 kDa und 46 kDa. Der unbehandelte Antikörper zeigte eine größere apparenete Molekularmasse als der Antikörper eigentlich laut Literatur aufweist. Dieses könnte durch unterschiedliche Konfigurationen, oder ein nicht optimales Einwandern, des SDS beladenen Antikörpers, in das Gel verursacht worden sein und hat keinen Einfluss auf die Optimierung der MeCAT-Modifikation. Für die teilreduzierten Antikörper konnten über den gesamten Konzentrationsbereich das gleiche Proteinmuster mit den vier signifikanten Proteinbanden bei 251 kDa, 66 kDa, 61 kDa und 46 kDa detektiert werden. Für die silbergefärbten Proteinmuster konnte kein signifikanter Unterschied für die drei eingesetzten, unterschiedlichen physiologischen Puffer; 200 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 25 mM EDTA (pH 7,4), 20 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4)) und 100mM Phosphat; 2,5 mM EDTA (pH 7,2) beobachtet werden (siehe Abbildung 15).

Im direkten Vergleich kann mit steigendem Reduktionsmittel eine Erhöhung der unteren Proteinbanden bei 36 kDa und 20 kDa beobachtet werden, der Antikörper liegt aber noch nicht vollständig reduziert vor (siehe Abbildung 15). Die vollständige Reduktion des Antikörpers ist im Anhang gezeigt und wurde ab einem 800-fachen molaren Überschuss an TCEP beobachtet (siehe 8 Anhang: Abbildung 57). Mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung und Silberfärbung der Gele konnte der Reduktionsgrad der teilreduzierten Antikörper an der Stärke und Lage der Banden abgeschätzt werden, so dass in einem weiteren Schritt das molare MeCAT-Verhältnis zum Antikörper bestimmt werden konnte. Dafür wurde der am stärksten teilreduzierte Antikörper eingesetzt (600-fache TCEP), um einen hohen

Markierungsgrad und damit hohe Signalintensitäten sowie günstige Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SNR) zu erzielen. Denn nur mit ausreichend hohen Signalintensitäten und SNR Werten ist eine Anwendung für biologische Proben im medizinischen Bereich aussagekräftig. In weiteren Versuchen wurde das optimale Verhältnis an Markierungsreagenz (MeCAT) zum Antikörper ermittelt.

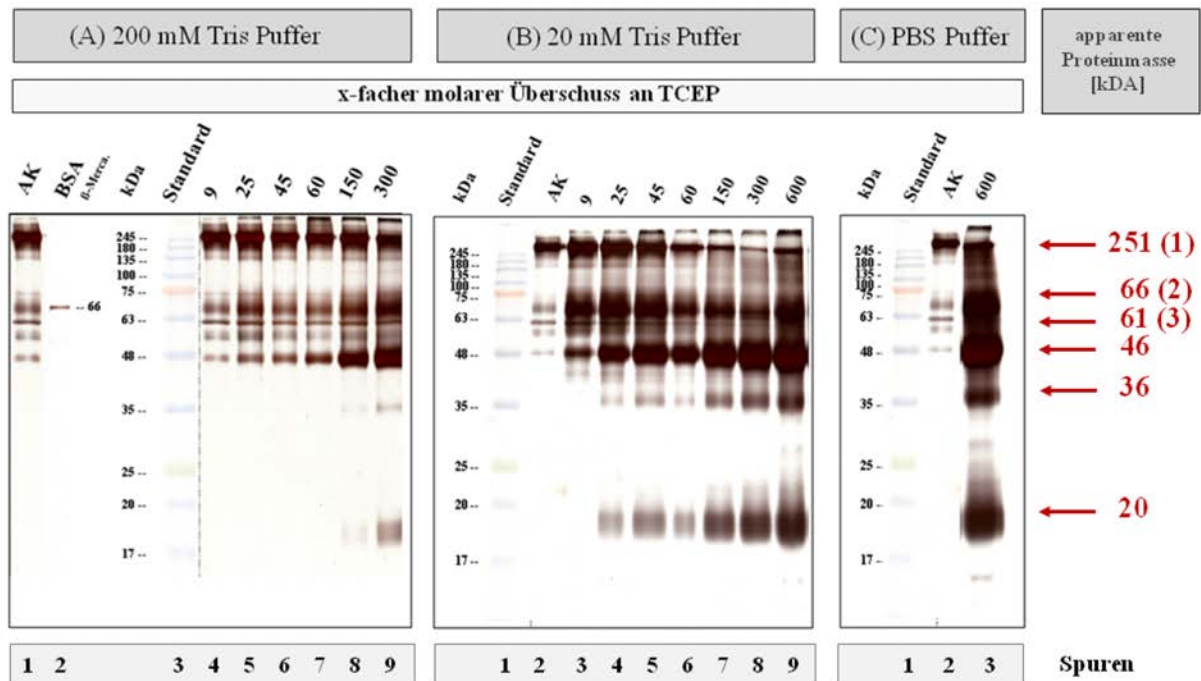


Abbildung 15 Einfluss des Überschusses an Reduktionsmittel (TCEP) auf die Reduktion der Disulfidbrücken eines Antikörpers unter Verwendung von drei unterschiedlichen Puffern. Es wurden jeweils 666,67 pmol Antikörper mit einem molaren Überschuss von 9 bis 600 an TCEP eingesetzt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden je 2 µg (13,33 pmol) des teilreduzierten Antikörpers pro Geltasche aufgetragen und mittels 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Zeigt die Reduktion mit einem 200 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 25 mM EDTA (pH 7,4)); Spur 1: unbehandelte Antikörper, Spur 2: BSA; Spur 3: Proteinstandard, Spur 4-9: 9-bis 300-facher molarer Überschuss an TCEP. (B) Zeigt die Reduktion mit einem 20 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4)); Spur 1: Proteinstandard, Spur 2: unbehandelte Antikörper; Spur 3-9: 9-bis 600-facher molarer Überschuss an TCEP. (C) Zeigt die Reduktion mit einem 100 mM Phosphat Puffer (2,5 mM EDTA (pH 7,2)); Spur 1: Proteinstandard, Spur 2: unbehandelte Antikörper; Spur 3: 600-facher molarer Überschuss an TCEP.

3.2.2 Metall-Markierung der Antikörper mit MeCAT

Zur Optimierung wurde der polyklonale Standardantikörper anti-Lysozym-Antikörper ($6,67 \text{ pmol}/\mu\text{L}$, $666,67 \text{ pmol}$) mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP ($4000 \text{ pmol}/\mu\text{L}$, 400000 pmol) teilreduziert und mit einem 10-, 20- und 45-fachen molaren Überschuss an MeCAT(Nd) für 30 min inkubiert. Nach elektrophoretischer Trennung und anschließendem Western Blotting erfolgte die Detektion mittels LA-ICP-MS auf dem Isotop ^{142}Nd (siehe Abbildung 16). Für die drei unterschiedlich stark modifizierten, teilreduzierten Antikörper zeigt das 2D Nd-Intensitätsprofil der Abbildung 16 (A) drei spezifische Proteinbanden (1-3) mit unterschiedlichen Signalintensitäten.

Im direkten Vergleich zu den silbergefärbten Gelen der Abbildung 15 konnten die drei Proteinbanden mit den apparenten Molekularmassen von (1): 251 kDa, (2): 66 kDa und C: 61 kDa zugeordnet werden.

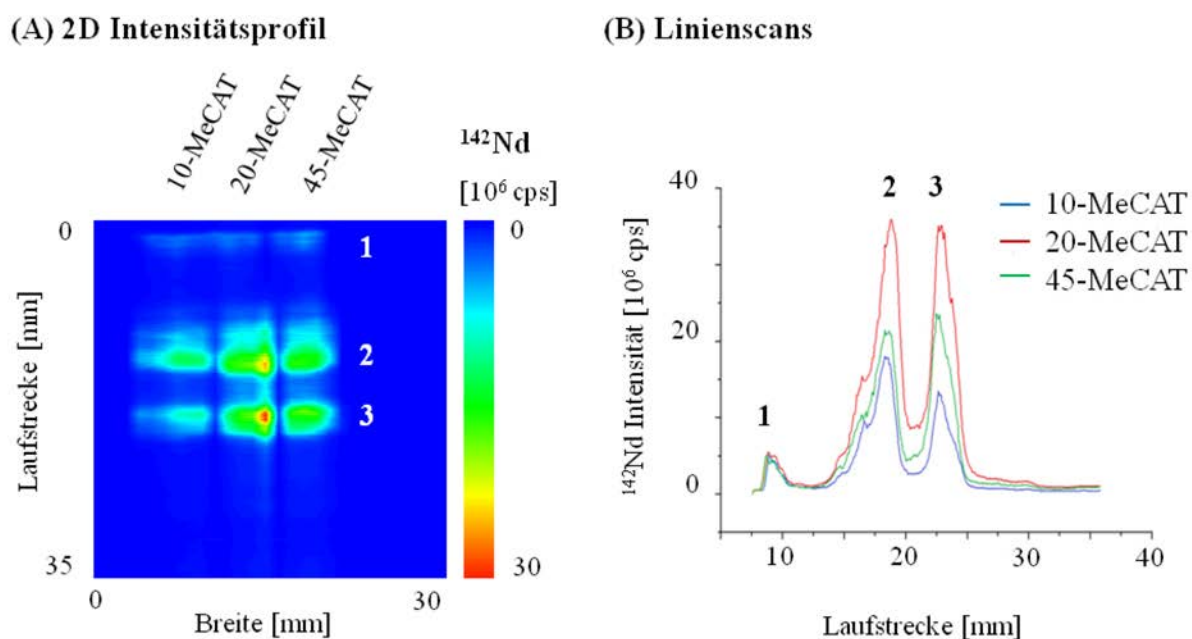


Abbildung 16 (A) LA-ICP-MS Intensitätsprofil des anti-Lysozym umgesetzt mit verschiedenen molaren MeCAT(Nd)-Überschüssen. (B) Die Summe der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der drei Spuren der elektrophoretisch aufgetrennten, teilreduzierten und unterschiedlich stark MeCAT-markierten anti-Lysozym-Antikörper. Die selektive Reduktion erfolgte mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP und drei verschiedenen MeCAT-Überschüssen. Mit Hilfe von einem 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen wurden die Reagenzüberschüsse entfernt. Es wurden je $3,75 \mu\text{g}$ (25 pmol) MeCAT-markierte Antikörper pro Geltasche aufgetragen. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von $200 \mu\text{m}$, Laserscangeschwindigkeit von $200 \mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von $0.20 - 0.25 \text{ mJ}$ und einer Laserfrequenz von 20 Hz .

Aus den LA-ICP-MS Daten wurde die Summe der Intensitäten des Nd-Signals über die Laufstrecke der Elektrophorese erzeugt, (siehe Abbildung 16 (2)) um die höchsten Signalintensitäten sowie Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) zu bestimmen. Aus der Abbildung 16 (B) geht hervor, dass die Proteinbande (2) (66 kDa) die höchsten Signalintensitäten liefert. Daher wurde exemplarisch für die drei unterschiedlich stark modifizierten Proteinmuster, die Proteinbande 2 mit einer hohen Antigen Bindungswahrscheinlichkeit für die Kalkulation der Peakhöhe [cps] und SNR gewählt (siehe Tabelle 1). Dafür wurde zusätzlich der Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD) und die relativen Standardabweichung (RSD) der Hintergrundsignale ermittelt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Zusammenfassung der kalkulierten Ergebnisse zur Beurteilung der optimalen MeCAT-Markierung.

MeCAT(^{146}Nd)	45-fach	20-fach	10-fach
RSD (Hintergrund) [%]	6	3	6
SNR [-]	685,45	1073,73	482,66

(Berechnung des Untergrunds von Laufstrecke 30 bis 35 mm)

Mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT wurden die höchsten Signalintensitäten mit $3,60\text{E}+07$ cps für die Proteinbande (2) ermittelt. Im direkten Vergleich der Proteinbanden (2) ist die Signalintensität des 20-fachen molaren Überschusses an MeCAT doppelt bzw. anderthalb mal höher als die Signalintensitäten mit einem 45-fachen und einem 10-fachen Überschuss an MeCAT. Das höchste SNR konnte mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT mit 1073,73 berechnet werden (siehe Tabelle 1). Somit konnte gezeigt werden, dass mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT(^{146}Nd) die höchsten Signalintensitäten und SNR für die teilreduzierten Antikörper erzielt wurden. Die besten RSDs für die Hintergrundsignale konnten ebenfalls mit dem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT erzielt werden. Dieser molare Überschuss an MeCAT entspricht den Herstellerangaben des MeCAT-Kits für Proteine (Proteome Factory, PM10001). Für die weitere Optimierung der Modifikation mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT wurde der Einfluss von unterschiedlichen physiologischen Puffern erprobt.

3.2.3 Einfluss des Puffers auf die Antikörpermarkierung

In diesem Kapitel wurde der Einfluss von zwei unterschiedlich konzentrierten Tris Puffern 200 mM Tris Puffer, (150 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 7,4), 20 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA, pH 7,4) auf die Markierung mit MeCAT nach der Teilreduktion untersucht. Auf die Verwendung eines 100 mM PBS Puffers wurde verzichtet, da im Abschnitt 3.2.1 kein signifikanter Reduktionsunterschied des teilreduzierten Antikörpers beobachtet werden konnte. Obwohl laut Herstellerangaben (Thermo Scientific) TCEP · HCL in PBS-Puffer bei neutralem pH-Wert nicht stabil [97] ist, konnte keine niedrigere Reduktion bzw. ein anderes Proteinmuster beobachtet werden. Zusätzlich würde der Einsatz eines PBS Puffers zu einer verminderten Reaktivität der Markierungsreagenzien führen, so dass ein Umpufferungsschritt mit Proteinverlusten vor der Markierung nötig wäre. Desweiteren versucht der Fachbereich von Dr. Jakubowski die Verwendung von Phosphat Puffern weitestgehend zu vermeiden, um das Untergrundsignal an Phosphor für die Phosphoproteomik so niedrig wie möglich zu halten. Für diese Untersuchung wurde ebenfalls der am stärksten teilreduzierte Antikörper eingesetzt, um einen hohen Markierungsgrad und damit hohe Signalintensitäten sowie SNR zu erzielen. Deshalb wurde der anti-Lysozym-Antikörper mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP und einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT unter Verwendung von zwei unterschiedlich konzentrierten Tris Puffern durchgeführt.

Für die zwei unterschiedlich konzentrierten Tris Puffer konnten pro Spur je zwei Proteinbanden mit unterschiedlich starken Signalintensitäten detektiert werden (siehe Abbildung 17 (A)). Im direkten Vergleich zu den silbergefärbten Gelen der Abbildung 15(C) handelt es sich um die apparenten Molekularmassen von Proteinbande (2): 66 kDa und (3): 61 kDa. Die Abbildung 17 (B) zeigt die Summe der Intensitäten des ^{142}Nd -Signals über die Laufstrecke der Elektrophorese erzeugt aus den LA-ICP-MS Daten.

Wie im Abschnitt 3.2.2 wurde exemplarisch für das Proteinmuster die Proteinbande 2 (hohe Antigen Bindewahrscheinlichkeit) mit den höchsten Signalintensitäten, für die Kalkulation der Peakhöhe [cps] und SNR gewählt (siehe Tabelle 2), um eine Anwendung der Markierungsstrategie für die LA-ICP-MS Detektion von medizinischen Proben zu ermöglichen.

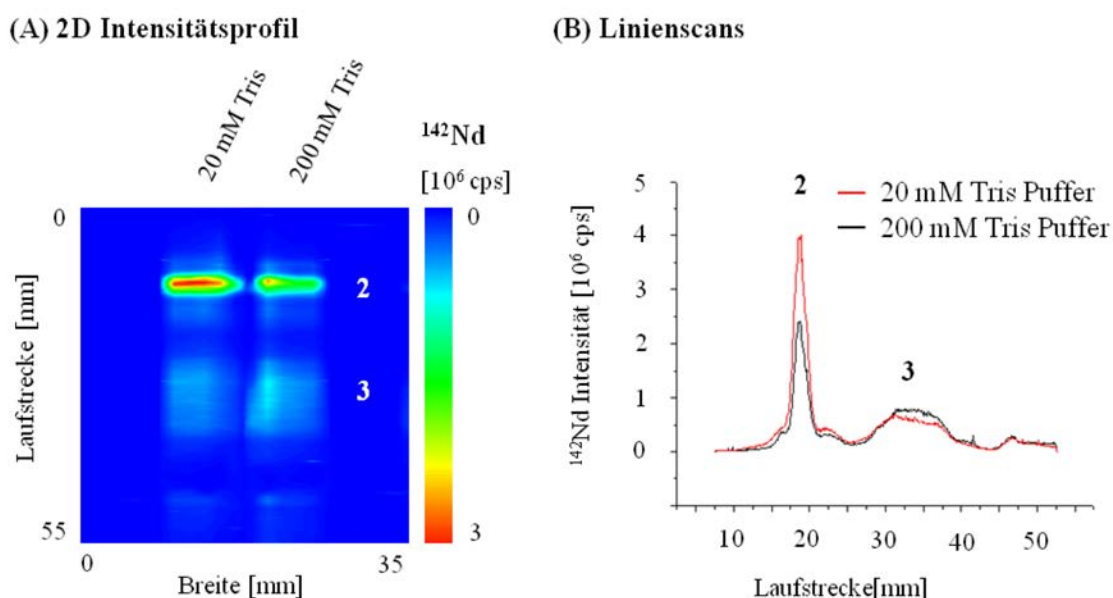


Abbildung 17 (A) LA-ICP-MS Intensitätsprofil des anti-Lysozym umgesetzt mit zwei unterschiedlich konzentrierten Puffern zur Optimierung der Markierungsstrategie. (B) Die Summe der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der zwei Spuren der elektrophoretisch aufgetrennten, teilreduzierten und MeCAT-markierten anti-Lysozym-Antikörper. Die selektive Reduktion erfolgte mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP und 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT. Mit Hilfe von einem 30 kDA *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen wurden die Reagenzüberschüsse entfernt. Es wurden je 3,75 μg (25 pmol) MeCAT-markierte Antikörper pro Geltasche aufgetragen. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 200 μm , Laserscangeschwindigkeit von 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz.

Tabelle 2 Zusammenfassung der kalkulierten Ergebnisse zur Beurteilung der optimalen MeCAT-Markierung.

Tris Puffer	20	200
SD [cps]	1,78E+03	1,17E+04
Peakhöhe [cps]	4,00E+06	2,40E+06
Intensität [cps/ μg]	1,07E+06	6,40E+05
NWG [μg]	4,70E-03	5,10E-02
SNR [-]	2250,19	206,08

(Berechnung des Untergrundsignals von Laufstrecke Abbildung 17 (B) : 8-12 mm)

Im direkten Vergleich der unterschiedlich stark konzentrierten Puffer, lieferte der 20 mM Tris Puffer signifikant höhere Signalintensitäten von 4,00E+06 cps und SNR Werte von 2250,19. Daher erfolgte die weitere Optimierung der Markierungsreaktion mit einem 20 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4)). Im Anschluss wurde für die Modifikation die Entfernung des MeCAT-Reagenzüberschüsse optimiert.

3.2.4 Aufreinigung der MeCAT-markierten Antikörper

Bei der Markierungsstrategie handelt es sich um eine zweistufige Reaktion. Im ersten Schritt erfolgte die selektive Reduktion mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP. Die Entfernung der TCEP Überschüsse erfolgte ausschließlich über Ultrafiltrationsröhrchen, um die Reduktionszeit von 30 min nicht zu überschreiten. Anschließend wurde der teilreduzierte Antikörper mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT modifiziert. Um eine optimale Entfernung der MeCAT-Reagenzüberschüsse mit einem geringen Antikörper Verlust zu erzielen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren, die Ultrafiltration und die Dialyse getestet. Zu diesem Zweck wurde ein 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Nanosep Centrifugal Filters), ein 50 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra Centrifugal Devices), eine Dialysekapsel (0,1 ml; Roth; H448.1) und eine Mini-Dialyseeinheit (10-100 μ L, Thermo Scientific) erprobt. Die Dialyse (4 h) ist wesentlich zeitintensiver, als die Ultrafiltration (3 x 5 min). Nach Entfernung der Reagenzüberschüsse wurde die Antikörper Konzentration nach Bradford (siehe Abschnitt 5.6.1) bestimmt.

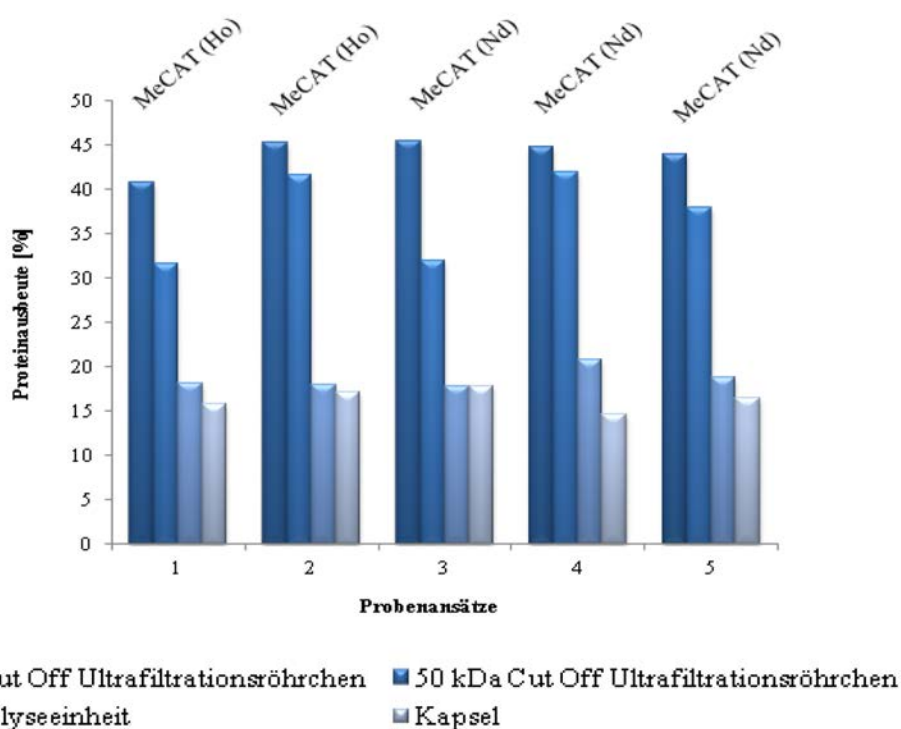


Abbildung 18 Konzentration der MeCAT-modifizierten Antikörper nach Entfernung des MeCAT-Überschusses mit zwei unterschiedlichen Ultrafiltrationsröhrchen, einem 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Nanosep Centrifugal Filters), einem 50 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra Centrifugal Devices), einer Mini-Dialyseeinheit (10-100 μ L, Thermo Scientific) und einer Dialysekapsel ((0,1 ml; Roth; H448.1) zur Optimierung der Modifikation. Es wurden fünf Probenansätze mit fünf Replikaten erzeugt.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Antikörper Konzentrationen nach der Entfernung der Reagenzüberschüsse sind in der Abbildung 18 zusammengefasst. Der direkte Vergleich zwischen den Aufreinigungstechniken zeigte signifikante Unterschiede in den Proteinkonzentrationen. Die geringste Antikörperausbeute von 6% und 19% wurde mit einer Dialysekapsel und einer Mini-Dialyseeinheit erhalten (siehe Anhang: Tabelle 26). Hingegen wurden signifikant höhere Antikörper Ausbeuten von 44% und 37% mit einem 30 kDa Cut Off- und 50 kDa Cut Off- Ultrafiltrationsröhrchen erzielt. Aufgrund der höheren Antikörperausbeute erfolgte die Entfernung der MeCAT-Überschüsse für die weiteren Versuche mit einem 30 kDa Cut Off Ultrafiltrationsröhrchen.

3.2.5 Immunoreaktion mit MeCAT-markierten Antikörper

Zur Kontrolle wurde der chemisch modifizierte anti-Lysozym-Antikörper in einer Immunofärbung mit Alkalischer Phosphatase (AP) eingesetzt, um die Spezifität, bzw. Reaktivität des Antikörpers zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde ein Dot Blot (siehe Abschnitt 2.5) mit drei Proteinen; BSA, β -Casein und Lysozym durchgeführt. Es wurden je acht Verdünnungsreihen pro Protein (20 pmol-0,02 pmol) auf eine NC-Membran getropft. Der primäre Antikörper wurde mit einer Konzentration von 3,33 fmol/ μ L (16,66 pmol) eingesetzt und mittels Sekundärantikörper Anti-Huhn IgY (1: 5000) detektiert (siehe Abbildung 19).

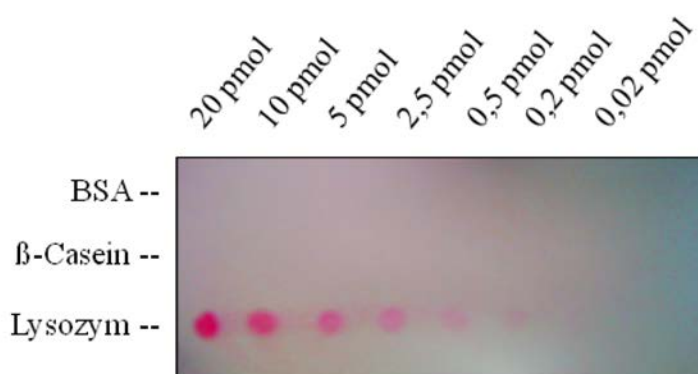


Abbildung 19 Zeigt den Einfluss der MeCAT-Modifikation auf die Spezifikation der Antikörper via Alkalische Phosphatase. Eine Dot Blot Membran wurde mit einer BSA, β -Casein und Lysozym Verdünnungsreihe versetzt und mit MeCAT-modifizierten primären anti-Lysozym-Antikörpern mit einer Konzentration von 3,33 fmol/ μ L (16,66 pmol) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem 1:5000 verdünntem Sekundärantikörper (Anti-Huhn IgY).

Mit Hilfe der immunologischen AP Färbung konnte ausschließlich die Lysozym Verdünnungsreihe detektiert werden. Der modifizierte Antikörper zeigt somit keine unspezifischen Bindungen zu den BSA und β -Casein Proben. Es konnten für den MeCAT-modifizierten, primären Antikörper Nachweisgrenzen von 20 fmol (0.02 pmol) für Lysozym ermittelt werden. Im Anschluss wurden die unterschiedlich stark modifizierten Antikörper in einer immunologischen Reaktion für die LA-ICP-MS Detektion eingesetzt.

3.2.6 Messung einer LA-ICP-MS Immunoreaktion mit modifizierten Antikörpern

Die Überprüfung der Reaktivität und Spezifität der MeCAT-markierten anti-Lysozym-Antikörper erfolgte im oberen Abschnitt 3.2.5 mit Hilfe einer immunologischen AP Färbung. Um die Signalstärke der unterschiedlich stark modifizierten Antikörper zu erfassen, wurden diese (9-600-facher molarer Überschuss an TCEP, 20-facher molarer Überschuss an MeCAT) in einer Immunoreaktion für die LA-ICP-MS eingesetzt. Der immunologische Nachweis der Antikörper-Antigen Konjugate erfolgte über die LA-ICP-MS Detektion der charakteristischen Lanthanid-Modifikationen der entsprechenden Antikörper. Dafür wurde das Protein Lysozym mit einer Konzentration von 3,5 pmol/ μ L (0,5 μ g) elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 5.6.2) und mittels Western Blot (siehe Abschnitt 5.6.3.1) auf einer NC-Membran immobilisiert. Für die immunologische Reaktion wurden unterschiedlich stark modifizierte primäre Antikörpern mit einer Konzentration von 3,33 fmol/ μ L (16,66 pmol) eingesetzt (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Der Nachweis der MeCAT(^{146}Nd)-modifizierten Antikörper-Antigen Konjugate erfolgt über das charakteristische Neodymsignal der LA-ICP-MS (siehe Abschnitt 5.1.2). Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 μ m, Laserscangeschwindigkeit von 250 μ m s $^{-1}$, Laserenergie von 0.20-0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz. Die Ergebnisse sind in Form von 2D Intensitätsprofilen in der Abbildung 58(A-D)-Abbildung 59(E-G) im Anhang zusammenfasst. Die je drei Proteinbanden pro NC-Membran sind in den 2D Intensitätsprofilen mit guten Kontrasten erkennbar und erwartungsgemäß zeigt der am geringsten modifizierte Antikörper (9-fache) schwache Signalthöhen von $1,5 \cdot 10^5$ cps, während der am stärksten modifizierte Antikörper (600-fach) die höchsten Signalthöhen von $5,5 \cdot 10^6$ cps liefert. Es konnten für den geringer modifizierten Antikörper höhere Schwankungen bei der Detektion, im Vergleich zu dem stärker modifizierten Antikörper beobachtet werden. Mit der LA-ICP-MS wurden nur kleine Teilbereiche des Proteinmusters auf der NC-Membran detektiert, um Geräteschwankungen

so niedrig wie möglich zu halten, da es zu Beginn dieser Arbeit keine verfügbaren internen Standards gabt (siehe 2.1.3). Aus den LA-ICP-MS Daten wurde die Summe der Intensitäten des Neodymsignals für die drei Proteinbanden (Spur1-3, siehe Anhang: Abbildung 58-59 links) über die Scanlaufstrecke des Lasers erzeugt (siehe Anhang: Abbildung 58-59 rechts). Somit konnte die Reproduzierbarkeit der Immunreaktion und die höchsten Signalintensitäten für die modifizierten Antikörper ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden die Peakflächen der jeweiligen drei modifizierten Antikörper-Antigenbanden integriert und als Linienscans dargestellt. Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeit und der berechneten SNR sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Die kalkulierten Reproduzierbarkeiten und SNR Werte bestätigen die ersten beobachteten Ergebnisse aus den 2D Intensitätsprofilen und Linienscans (siehe Anhang: Abbildung 58-Abbildung 59). Der mit einem 9-fachen molaren Überschuss an TCEP reduzierte Antikörper liefert für die drei Proteinbanden relative Standardabweichungen (RSD) von 49%. Hingegen konnte für den mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP reduzierten Antikörper ein sehr guter RSD Werte von 8% bestimmt werden. Die Standardabweichungen (SD) sind in diesem Fall sehr gute Indizien für eine reproduzierbare Immunreaktion. Für die Optimierung der Markierungsstrategie sind hohe Signalintensitäten mit guten SNRs entscheidend, um die Kombination der Immunreaktion mit der LA-ICP-MS für die klinische Anwendung auf biologischem Material, wie zum Beispiel Gewebeschnitten, zu ermöglichen. Der mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP teilreduzierte Antikörper lieferte den signifikant höchsten SNR Wert von 107.

Tabelle 3 Zusammenfassung der LA-ICP-MS detektierten Proteinbanden mit den gleichen Konzentrationen zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit und SNR Werte der Immunoreaktion.

[count]	9	25	45	60	150	300	600
A 1	3,27E+05	1,44E+06	4,47E+06	2,30E+06	4,68E+06	2,99E+06	2,16E+07
A 2	4,36E+05	1,08E+06	3,52E+06	3,55E+06	3,16E+06	2,15E+06	2,06E+07
A 3	8,15E+05	2,02E+06	3,04E+06	3,17E+06	3,83E+06	3,21E+06	2,41E+07
Mittelwert	5,26E+05	1,51E+06	3,68E+06	3,01E+06	3,89E+06	2,78E+06	2,21E+07
SD	2,56E+05	4,74E+05	7,28E+05	6,41E+05	7,62E+05	5,59E+05	1,80E+06
RSD [%]	49	31	20	21	20	20	8
A (Untergrund 1)	2,97E+04	1,52E+05	2,55E+05	2,23E+05	2,72E+05	1,81E+05	2,05E+05
A (Untergrund 2)	4,51E+04	1,14E+05	2,46E+05	2,72E+05	2,29E+05	1,67E+05	2,12E+05
A (Untergrund 3)	3,98E+04	1,44E+05	2,40E+05	2,21E+05	2,87E+05	1,71E+05	2,02E+05
A (Mittelwert)	3,82E+04	1,37E+05	2,47E+05	2,39E+05	2,63E+05	1,73E+05	2,06E+05
SNR	14	11	15	13	15	16	107

Peakfläche (A), Standardabweichung (SD), Signal-Rausch-Verhältnis (SNR)

Zusammenfassend: Das optimale Markierungsverhältnis mit sehr guten Reproduzierbarkeiten, hohen Signalintensitäten und SNRs lieferte der mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP teilreduzierte und mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT-modifizierte Antikörper. Um sicher zu stellen, dass das bisher optimale Markierungsverhältnis die höchsten durchschnittlichen Markierungsgrad aufweist und die Markierungsstrategie eine reproduzierbare Modifikation liefert, wurde via ICP-MS-System für flüssige Proben der Metallgehalt pro Antikörper quantifiziert.

3.2.7 Quantifizierung der Metall-markierten Antikörper

Nach der Markierung der Antikörper mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP und einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT wurde die Proteinkonzentration der modifizierten Antikörper nach Bradford bestimmt (siehe Abschnitt 5.6.1). Anschließend wurde der Metallgehalt der modifizierten Antikörper als Lösung mittel ICP-MS quantifiziert (siehe Abschnitt 5.1.1), um den durchschnittlichen Markierungsgrad zu bestimmen. Bei dem durchschnittlichen Markierungsgrad handelt es sich um den Metallgehalt pro Antikörper. Da es sich bei dem modifizierten Antikörper um ein Gemisch aus Antikörperfragmenten mit unterschiedlicher Anzahl an MeCAT-Modifikationen handelt, wird über das ICP-MS-System von Flüssigkeiten ein durchschnittlicher Metallgehalt ermittelt.

Die von Waentig *et al.* [55] entwickelte und optimierte Markierungsstrategie für primäre Antikörper mit einem Lanthanid beladenem p-SCN-Bn-DOTA-Komplex, zeigte einen durchschnittlichen Markierungsgrad von 0,03. Für die neue Markierungsstrategie mit dem Lanthanid beladenem MeCAT wird ein höherer Markierungsgrad mit einer deutlichen Signalsteigerung erwartet. Die Markierungsbedingungen sind deutlich harscher, um eine höhere Anzahl an Markierungsreagenz an den primären Antikörper zu binden und eine signifikante Signalintensitätssteigerung zu erzielen. Die Markierung erfolgte unter optimalen Markierungsverhältnissen an drei unterschiedlichen Arbeitstagen. Es wurden insgesamt drei unterschiedlich Lanthanid-beladenen (^{165}Ho , ^{166}Er , ^{142}Nd) MeCAT-Reagenzien eingesetzt. Die Markierungsgrade für die unterschiedlichen Lanthanid-beladenen MeCAT-Reagenzien ist in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Zusammenfassung der Markierungsgrade für die optimierte Modifikationsstrategie.

Lanthanid (Ln)	MeCAT(Ln) [pmol]	Antikörper [pmol]	durchschnittlicher Markierungsgrad [-]
¹⁶⁵ Ho	2,11	0,62	3,40
¹⁶⁵ Ho	17,34	5,93	2,92
¹⁶⁵ Ho	17,4	5,24	3,32
¹⁶⁵ Ho	17,97	5,93	3,03
¹⁶⁶ Er	8,22	2,65	3,10
¹⁴² Nd	35,1	10,47	3,35
¹⁴² Nd	43,8	13,88	3,16
¹⁴² Nd	76,61	21,02	3,64
¹⁴² Nd	46,58	15,15	3,07
Mittelwert der durchsch. Markierungsgrade			3,22
Standardabweichung (SD) [-]			2,25E-01
relative Standardabweichung [%]			7

Mit dem optimalen Markierungsverhältnis konnte unter physiologischen Bedingungen ein durchschnittlicher Markierungsgrad für neun Markierungswiederholungen von ca. 3 mit einer RSD Wert von 7% detektiert werden. Im direkten Vergleich zu dem p- SCN-Bn-DOTA-Komplex konnte eine deutliche Steigerung des durchschnittlichen Markierungsgrades um den Faktor 100 erzielt werden. Wie erwartet konnten keine Markierungsunterschiede zwischen den charakteristischen ¹⁶⁵Ho, ¹⁶⁶Er und ¹⁴²Nd beladenen MeCAT-Reagenzien bei der Quantifizierung des durchschnittlichen Markierungsgrades ermittelt werden. Auch für die nicht optimal modifizierten Antikörper wurde ein durchschnittlicher Markierungsgrad um ca. 1 bestimmt (siehe Anhang: Tabelle 27). Die optimierte Markierungsstrategie liefert unter physiologischen Reaktionsbedingungen, mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP, einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT unter Verwendung von einem 30 kDa Cut Off Ultrafiltrationsröhrchen reproduzierbare Markierungsgrade und in immunologischen Reaktionen sehr hohe Signalintensitäten und hervorragende SNR Werte. Nach erfolgreicher Optimierung der Markierungsstrategie erfolgte die erste Test-Anwendung auf klinisch-relevante Antikörper und deren Optimierung für die immunologische Reaktion auf Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte (siehe Material und Methoden, Kapitel 5.2.4.3). Zuvor wurden neue Standardisierungsstrategien entwickelt, da es für die LA-ICP-MS Detektion keine kommerziellen Kalibrierstandards und internen Standards gibt. Zunächst wurde der interne Standard und Kalibrierstandard auf NC-Membranen als Referenzmaterial erprobt (siehe Material und Methoden, Kapitel 5.4).

3.3 Anwendung der MeCAT-modifizierten Antikörpern in der IHC

3.3.1 Optimierung der Probenvorbereitung

Die erste Anwendung der Markierungsstrategie erfolgte an einem Paraffin-bindungsfähigen anti-Her2-Antikörper. Der humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (Her2) ist ein wichtiger Tumormarker der in der klinischen Routine-Diagnostik in Brustgewebeschnitten nachgewiesen wird um den Krankheitsverlauf, bzw. die Medikation zu bestimmen. Unter den optimierten Reaktionsbedingungen wurde der anti-Her2-Antikörper mit MeCAT(^{174}Yb)- und MeCAT(^{165}Ho)-modifiziert und anschließend in einer immunologischen Reaktion mit Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten inkubiert (siehe Abbildung 29; Abschnitt 5.4.2.1) und optimiert.

Zu diesem Zweck wurde der mit MeCAT(^{174}Yb)-modifizierte anti-Her2-Antikörper mit drei 5 μm dicken Brustkrebsgewebeschnitten für je 3h bei RT, 1 h und 3 h bei 37°C inkubiert, um die optimale Inkubationszeit, bzw. gute SNRs bei LA-ICP-MS Analyse zu erzielen (siehe Abbildung 20 (A), siehe Anhang: Abbildung 65).

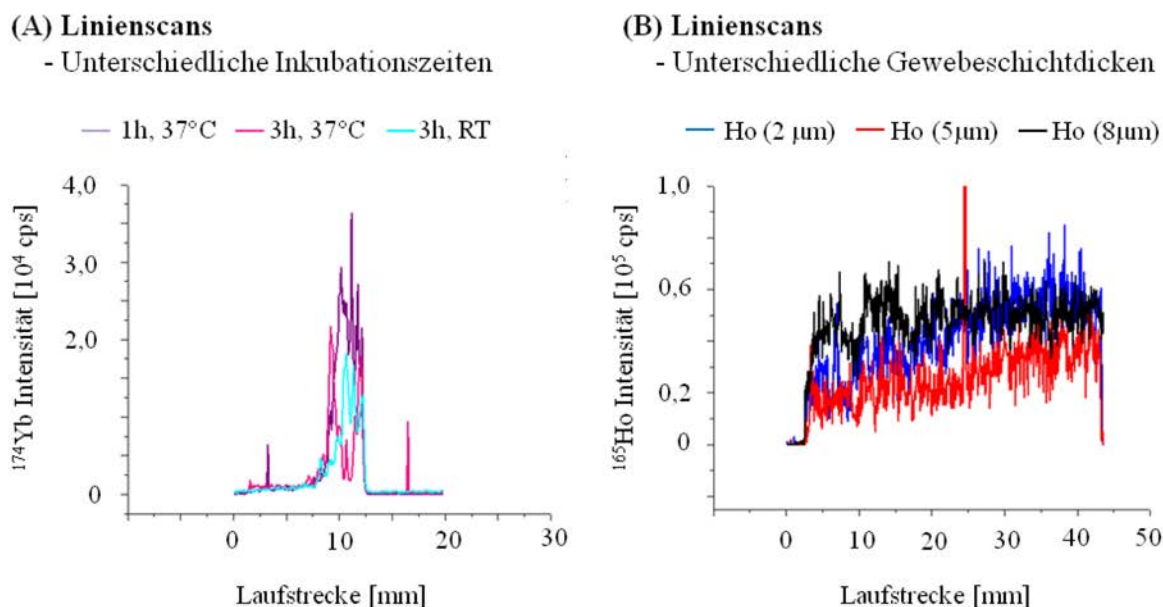


Abbildung 20 Zeigt die Summe der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für die Optimierung der Inkubationszeit (A) und der Gewebeschichtdicke (B) für jeden Gewebeschnitt. Die Schnitte wurden mit zwei MeCAT(^{174}Yb und ^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörpern mit einer Konzentration von 3,33 fmol/ μL (16,66 pmol) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 μm , Laserscangeschwindigkeit von 250 μm s $^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ (35%) und einer Frequenz von 20 Hz.

In einem weiteren Optimierungsschritt wurde der MeCAT(^{165}Ho)-modifizierte anti-Her2-Antikörper mit drei unterschiedlich dicken Gewebeschnitten à 2 μm , 5 μm und 8 μm für 1 h bei 37°C inkubiert (siehe Abbildung 20 (B)). Die Gewebeschnitte wurden mittels LA-ICP-MS detektiert, mit einer Laserspotgröße von 250 μm , Laserscangeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ (35%) und einer Frequenz von 20 Hz. Bei der Detektion konnte, wie bereits erläutert, kein interner Standard eingesetzt werden. Daher wurde bei der Optimierung hauptsächlich auf relative Signalintensitätsunterschiede geachtet. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die Summe der Intensitäten der Lanthanidsignale für die jeweiligen Gewebeschnitte über die Scanlaufstrecke des Lasers erzeugt.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 20 illustriert. Die Untersuchung der Inkubationszeit der modifizierten Antikörper bei der immunologischen Reaktion mit dem Brustkrebsgewebe ergab keine signifikanten Unterschiede. Für die Optimierung der Inkubationszeit konnten folgende Signalthöhen $2,6 \cdot 10^4$ cps für 1 h bei 37°C, $1,6 \cdot 10^4$ cps für 3 h bei 37°C und $1,6 \cdot 10^4$ cps für 3 h bei Raumtemperatur (RT) ermittelt werden (siehe Abbildung 20). Deshalb erfolgten alle weiteren Inkubationen der Gewebeschnitte bei 37°C für 1 h. In einem weiteren Versuch wurde die optimale Schichtdicke der Gewebeschnitte auf die höchste Signalintensität ermittelt. Die Abbildung 20 (B) zeigt keine Abhängigkeit zwischen der Signalintensität und der Gewebeschichtdicke. Im Mittel konnten für die 2 μm , 5 μm und 8 μm dicken Gewebeschnitte eine Signalthöhe von ca. $0,5 \cdot 10^5$ cps detektiert werden. Somit konnte kein Eindringen des markierten Antikörpers in die Gewebeschichtdicke detektiert werden. Daher wurde für alle weiteren Versuche eine für die IHC gängige Gewebeschichtdicke von 5 μm gewählt. Grundsätzlich wurde die immunologische Reaktion mit den modifizierten Antikörpern der regulären IHC-Färbung, hinsichtlich der verwendeten Puffer und Vorbehandlungen des Gewebes angepasst (siehe 5.6.6.1).

3.3.2 Optimierung der LA-ICP-MS Detektion

Die ersten LA-ICP-MS Experimente zur Verbesserung der Bildqualität der 2D Intensitätsprofile von Gewebeschnitten mit MeCAT-markierten Antikörpern basierten auf der Forschung von Giesen *et al.* In ihrer Forschungsarbeit wurden anti-Her2-Antikörper mit einem SCN-DOTA (^{165}Ho) markiert [52] und für die Analyse von Brustkrebs in

Gewebeschnitten unter folgenden optimierten Laserparametern analysiert; Laserspotgröße 200 μm , Laserscangeschwindigkeit 200 $\mu\text{m s}^{-1}$. Mit einem SCN-DOTA (^{165}Ho) modifizierten anti-Her2-Antikörper konnten maximale Signalintensitäten von $1,0 \cdot 10^4$ cps unter Verwendung der oben angegebenen Laserparameter erzielt werden.

Im Gegensatz dazu, konnte mit einem MeCAT(^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörper, unter Verwendung derselben Laserparameter, maximale Signalintensitäten von $1,2 \cdot 10^5$ cps erreicht werden, somit konnten mit dem neuen Markierungsreagenz eine Signalsteigerung um den Faktor 12 erzielt werden. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Signalintensität von der biologischen Probe bzw. von dem Tumorgrad des Gewebeschnittes abhängen können, so dass ein direkter Vergleich nur begrenzt zulässig ist.

Als Folge der hohen Signalintensitäten konnte der Durchmesser des Laserstrahls verkleinert werden (siehe Abbildung 21). Es war möglich, trotz geringerer ablatierter Fläche, reproduzierbare Signalintensitäten oberhalb des Untergrundsignales zu erzeugen. Die Laserparameter, wie die Laserspotgröße, wurden proportional zur Laserscangeschwindigkeit variiert. Um einen vollständigen Abtrag der Probe zu gewährleisten wurden die Laserspotgrößen mit einer Überlappung von 20 μm eingestellt, so dass sich folgende Laserparameter in Abbildung 21 ergaben; (A) 180 μm , 200 $\mu\text{m s}^{-1}$ (B) 80 μm , 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ und (C) 30 μm , 50 $\mu\text{m s}^{-1}$.

Für einen direkten Vergleich, bzw. zur Validierung der LA-ICP-MS Analysen, sind die 2D Intensitätsprofile mit den entsprechenden IHC-Färbungen der Tumorbereiche gezeigt. Die charakteristischen Bereiche der positiven Tumorareale mit einer hohen Wiedererkennung sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

Es konnten Ho-Signalintensitäten von $1,2 \cdot 10^5$ cps mit 180 μm Laserdurchmesser, $3 \cdot 10^4$ cps mit 80 μm und $5 \cdot 10^3$ cps mit 30 μm detektiert werden (siehe Abbildung 21 A-C). Mit Verringerung der Spotgröße verringern sich die detektierten Ho-Signalintensitäten um eine Größenordnung. Trotz Verringerung der Ho-Signalintensitäten konnte für eine Laserspotgröße von 30 μm noch ein ausreichendes Signal-Hintergrund-Verhältnis (SBR) von 15, für 80 μm ein SBR Wert von 19 und für 180 μm von 33 bestimmt werden. Aufgrund der hohen Signalintensität konnten geringere Spotgrößen mit ausreichenden Werten und somit höhere Bildauflösungen für die LA-ICP-MS Detektion von tumorösem Brustgewebeschnitten erzielt werden.

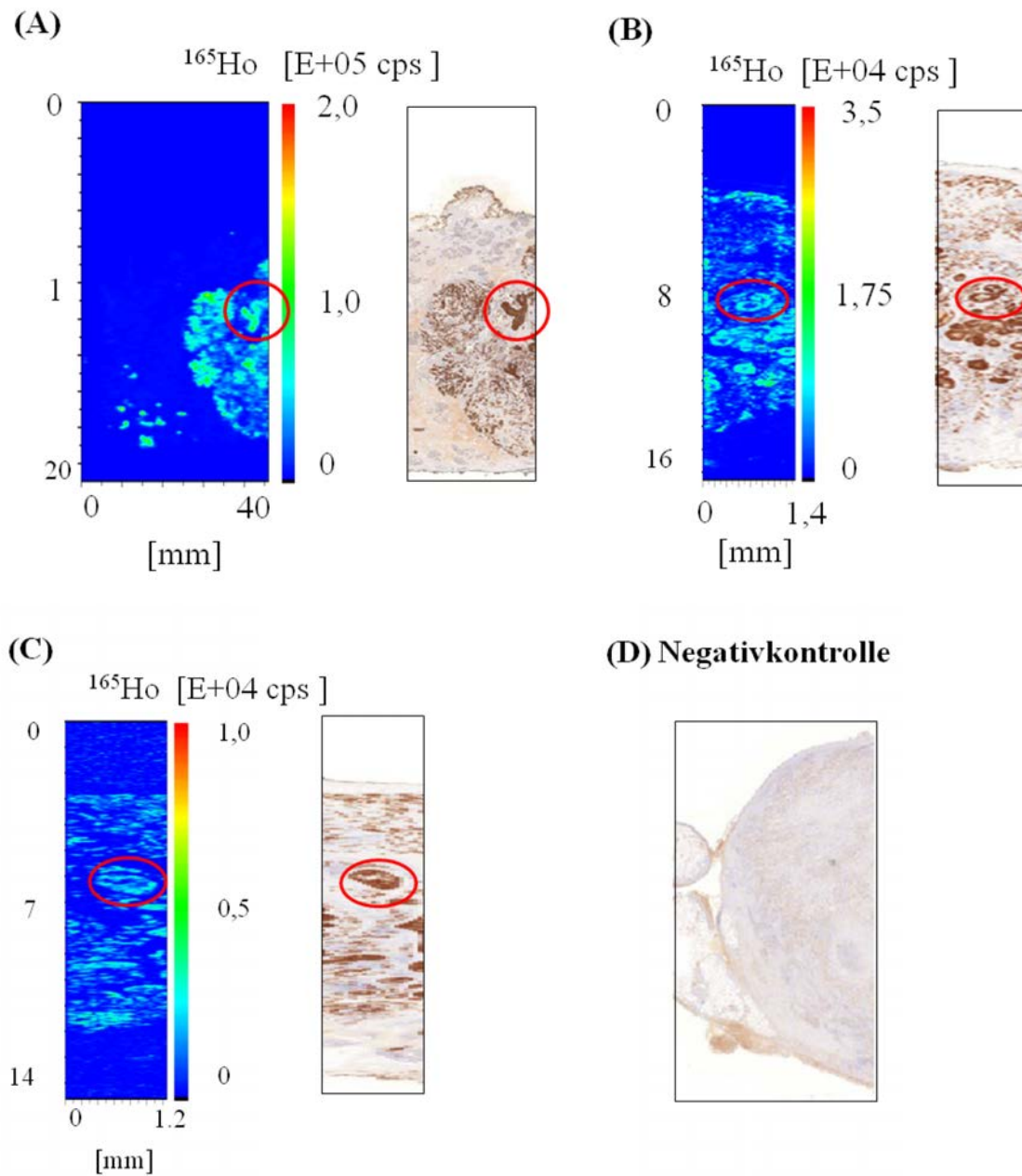


Abbildung 21 Zeigt die LA-ICP-MS 2D Intensitätsprofile von ^{165}Ho im direkten Vergleich zu den konventionellen IHC-Färbungen. Es wurden 5 μm dünne Brustgewebeschnitte detektiert, die positiv (A-C) und negativ (D) auf den anti-Her2-Antikörper sind. Die resultierenden 2D Intensitätsprofile wurden durch Variation der Laserparameter erzeugt (A-C). Die charakteristischen Bereiche der positiven Tumorareale sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Laserparameter: (A) Laserspotgröße von 180 μm , Laserscangeschwindigkeit von 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, (B) Laserspotgröße von 80 μm , Laserscangeschwindigkeit von 100 $\mu\text{m s}^{-1}$, (C) Laserspotgröße von 40 μm , Laserscangeschwindigkeit 50 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

3.4 Entwicklung eines internen Standards und Kalibrierstandards für die LA-ICP-MS Anwendung

3.4.1 Einleitung

Die LA-ICP-MS Detektion wird derzeit noch durch das Fehlen von kommerziell erhältlichen internen Standards und Kalibrierstandards eingeschränkt. Es gibt unterschiedliche Ansätze zur Standardisierung der LA-ICP-MS, wie natürlich homogen Elementvorkommen, künstlich beigelegte, oder aufgetragene Elemente und individuelle, matrixangepasste Standards (siehe Einleitung 1). Um die LA-ICP-MS für die klinische Diagnostik nutzbar zu machen, war es notwendig, eine zuverlässige interne Standardisierung zur Korrektur von Laser- und ICP-MS-Schwankungen, sowie zum Ausgleich von Inhomogenitäten der Gewebeschichtdicke, zu entwickeln.

In Vorversuchen wurde der Druckprozess und die interne Standardisierung erprobt (siehe Kapitel 3.4.1.1- 3.4.1.3). Die Untersuchungen zum Kalibrierstandard werden im Kapitel 3.4.2 detailliert beschrieben. Als interner Standard wurde das Element Indium ausgewählt, da es eine ähnliche erste Ionisierungsenergie (In: 5,786 eV; Pr: 5,47 eV, Er: 6,10 eV, Ho: 6.02 eV) [158] und Atomgewicht wie die zu untersuchenden Analyten (Lanthanide) besitzt, so dass man von einem annähernd gleichem Ionisationsverhalten von Analyt und internem Standard im Plasma während der LA-ICP-MS Detektion ausgehen kann.

Zudem muss ein interner Standard homogen auf der Probe verteilt sein oder in konstanter Konzentration während der Detektion zugesetzt werden, um Schwankungen während der Analyse zu korrigieren. Die Testversuche zur Untersuchung der Drucktechnik erfolgten mit einer Indium-versetzten Tinte, unter Verwendung eines konventionellen Tintenstrahldruckers (siehe Material und Methoden 5.4). Die Tinte wurde vollständig über eine unbehandelte NC-Membran gedruckt und mittels ICP-MS untersucht. Dafür mußte zunächst das Absorptionsverhalten der gelben Tinte, die Homogenität und Reproduzierbarkeit des Druckprozesses, sowie die Leistungsfähigkeit des internen Standards überprüft werden (siehe Kapitel 3.4.1.1- 3.4.1.3).

3.4.1.1 Einfluss der farbigen Tinte auf die Laserabsorption

Um eine Absorption der gelb gefärbten Tinte auf das UV-Licht des Lasers bei der Ablation ausschließen zu können, wurde für den internen Standard die Tinte so transparent wie möglich auf die Membran aufgebracht. Für die Evaluierung der Tinte wurde diese auf eine ähnliche Konzentration, wie beim Drucken, mit Wasser verdünnt, und mit einem Photometer (Varian, USA) wurde das Absorptionsspektrum unter Verwendung von Wasser als Blindwert bestimmt. Es konnte keine signifikante erhöhte Absorption bei einer Wellenlänge von 213 nm beobachtet werden (siehe Anhang: Abbildung 60-61). Daher konnte eine Beeinträchtigung der Laserabsorption durch die farbige Tinte vernachlässigt werden.

3.4.1.2 Homogenität und Reproduzierbarkeit des Druckprozess

Der homogene Druckprozess muss zwei Bedingungen erfüllen, zum einen muss eine Homogenität über einen großflächigen Bereich zur Korrektur von Drifteffekten des Lasers und des ICP-MS Gerätes, sowie eine lokale Homogenität für die eingesetzte Laserspotgröße gewährleistet werden. Das Bedrucken der NC-Membran mit Indium soll für die interne Standardisierung der LA-ICP-MS Detektion von festen Proben genutzt werden.

Um eine großflächige Homogenität des Druckprozesses zu bestätigen wurde mit einer 20%igen Druckdichte eine Indium-versetzte Tinte (*LA-In-Ink*) vollständig über eine unbehandelte NC-Membran (56 cm²) gedruckt. Für die Bestimmung des Indiumgehaltes auf der gesamten Membran, erfolgte eine Konzentrationsbestimmung nach Auflösen der Membran mittels ICP-MS. Dafür wurden vier Membranstücke mit einer Größe von 1 cm² an vier verschiedenen Bereichen auf der Membran ausgeschnitten und aufgelöst. Um den Analyten Indium in der Lösung zu quantifizieren wurden der Lösung Praseodym (¹⁴¹Pr) als interner Standard beigelegt (siehe Anhang: Tabelle 28, Material und Methoden 5.1.1.2). In diesem Versuch konnten für die normierten Signalintensitäten, bezogen auf das Gewicht der Membranstücke, relative Standardabweichungen von 5% erzielt werden. Da aus diesem Experiment nicht eindeutig bestimmt werden konnte, welcher Fehlerbeitrag vom eigentlichen Druckprozess und welcher von der ICP-MS Messung der aufgelösten Membranstücken resultiert, wurde die vollständige Indium bedruckte Membran zusätzlich mittels LA-ICP-MS im Lasereinzelschussmodus untersucht.

Bei homogener Bedruckung soll das Einzelschussexperiment einen linearen Zusammenhang zwischen Laserspotgrößen und Indium Signalintensität der Peakhöhe zeigen. Dafür wurden Laserspotgrößen von 25 μm , 50 μm , 100 μm und 250 μm für den Laserabtrag mit je 12 Wiederholungen (N) verwendet. Die Einzelschüsse sind mit hohen Schwankungen behaftet, da sie sehr empfindlich auf Änderungen der Laserenergie, des Probenabtrages, der Ionisierung und des Transportes reagieren (siehe Anhang: Tabelle 29). Je größer der Laserabtrag desto niedriger sind die RSDs (N=12) für die Einzelschussmessungen. So konnte zum Beispiel für einen Laserspotdurchmesser von 250 μm und 25 μm ein RSD von 10% bzw. 58% berechnet werden. Trotzdem konnte ein linearer Zusammenhang zwischen steigendem Laserabtrag bzw. Laserspotgröße und der Indium-Intensität beobachtet werden ($R^2 = 0,9964$, siehe Anhang: Abbildung 61, Tabelle 29). Mit Hilfe dieses Experimentes konnte eine gute Homogenität über eine große bedruckte Membranfläche nachgewiesen werden und zwar für alle hier verwendeten Laserspotgrößen.

Um die Reproduzierbarkeit und Homogenität der Drucktechnik für einen kleinen Bereich, nahe an den gängigen, stabilen LA-ICP-MS Messbedingungen, im Linienscan Modus zu untersuchen, wurden sechs identische Rechtecke (3 mm^2) mit einer Indium-, Thulium-, Luthetium- und Neodym-versetzten Tinten auf eine NC-Membran gedruckt (siehe Abbildung 22).

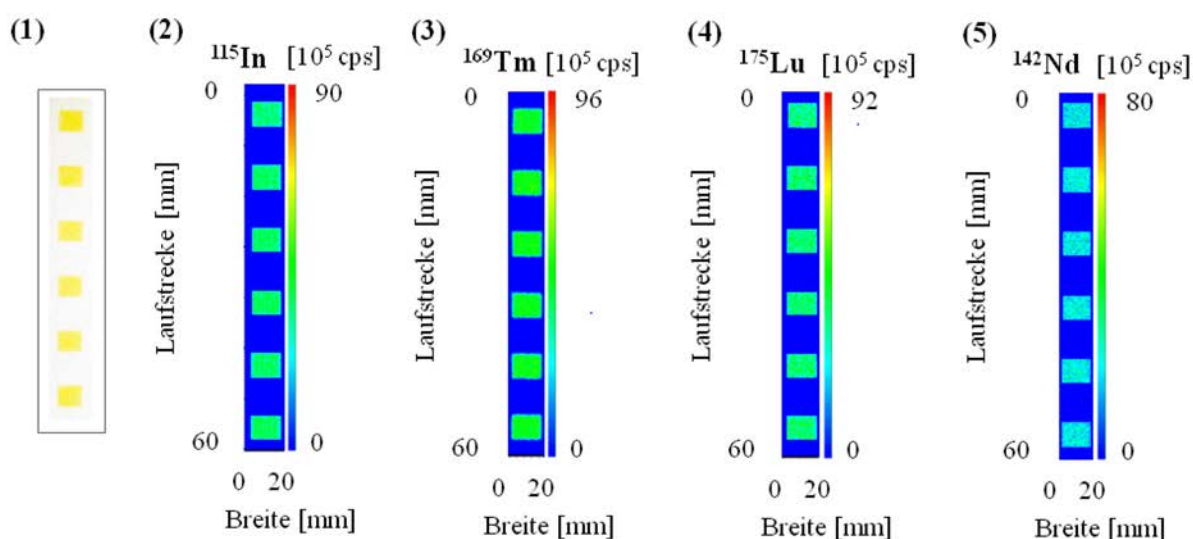


Abbildung 22 Zeigt (1) ein Foto der gedruckten Rechtecke und (2-5) der 2D Intensitätsprofile der gedruckten Rechtecke für die Elemente In, Tm, Lu und Nd. Die Detektion erfolgte mit folgenden Laserparametern: Spotdurchmessern: 180 μm , Geschwindigkeit: 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Energie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Die Rechtecke wurden vollständig im Linienscan-Modus abgerastert. Es konnten hervorragende RSDs von 1-2% für die sechs Rechtecke ermittelt werden (siehe Anhang: Tabelle 30).

Der Versuch im Linienscan-Modus läßt auf eine ausgezeichnete Lasersstabilität bei der Detektion, sowie eine hervorragende Reproduzierbarkeit des Druckprozesses schließen.

3.4.1.3 Kompensation von Messschwankungen durch den gedruckten internen Standard

Die hier eingesetzte Drucktechnik liefert sowohl für große, als auch für kleine Druckflächen eine ausreichende Homogenität. In einem weiteren Versuch wurden die Messschwankungen während einer längeren Detektion, unter Verwendung der Standardisierung erfasst, um die Leistungsfähigkeit des internen Standards zu demonstrieren, denn die Detektion von großen Gewebeproben kann sehr zeitaufwändig sein, je nach eingesetzter Laserspotgröße und Laserscangeschwindigkeit.

Die LA-ICP-MS Analyse bzw. der Laserabtrag von einer 100 mm x 100 mm großen Fläche, die der Größe einer regulären Blotmembran entspricht, dauert mit einer Laserspotgröße von 180 μm und einer Laserscangeschwindigkeit von 180 $\mu\text{m s}^{-1}$ ca. 5 h. Daher ist die Sicherstellung von stabilen Signalintensitäten über einen längeren Zeitraum für eine LA-ICP-MS Detektion essentiell. Ein Verlauf der Signalintensitätsschwankungen ist in der Abbildung 23 zu unterschiedlichen Tageszeiten gezeigt. Dafür wurde eine homogen, mit Indium bedruckte Membran über einen Zeitraum von 12 h, mittels LA-ICP-MS im Linienscan-Modus, vollständig ablatiert. Aus den Lasermessdaten wurden die Summen der Intensitäten, der einzelnen Linienscans für die Detektion der drei Messblöcke, an einem regulären Arbeitstag gebildet. Für die Signalintensitäten einer ca. vier-stündigen Messung, nach Inbetriebnahme und einem 30 min langem Warmlaufen des Gerätes, konnte ein RSD Wert von 15% ermittelt werden (Abbildung 23, grün). Eine darauf folgende vierstündige Detektion am Nachmittag zeigt eine Stabilisierung der Signalthöhen, allerdings nur für ein paar Stunden, so dass ein RSD Wert von 13% detektiert wurde (Abbildung 23, rot). Das bedeutet, dass die standardisierte Aufwärmphase von 30 min für den Laser zur Erzeugung von stabilen Signalintensitäten nicht ausreicht. In einer weiteren vierstündige Detektion, die über Nacht erfolgte, konnten starke Schwankungen mit RSD Wert von 18% berechnet werden (Abbildung 23, blau). Diese Schwankungen stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit

Temperaturveränderungen im Labor. Bei Langzeitmessungen konnten durchschnittliche Abweichung von $\pm 10\%$ vom ursprünglichen Signal beobachtet werden, so dass eine interne Standardisierung zwangsläufig notwendig ist.

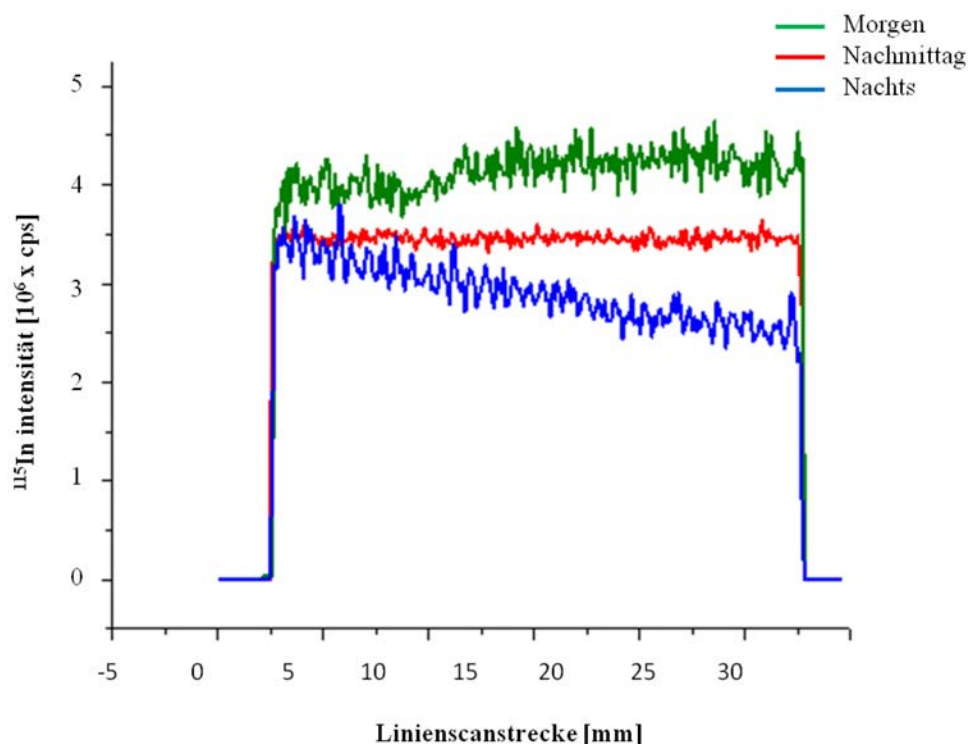


Abbildung 23 Zeigt den Intensitätsverlauf einer LA-ICP-MS Messung über einen Messtag. Die Signalintensitätsschwankungen nach Inbetriebnahme des Messgerätes sind grün gekennzeichnet (4 h); der rote Linienscan ist die Signalintensität nach einer vier stündigen Detektion und der blaue Linienscan zeigt eine Detektion nach 12 h. Laserparameter: Spotdurchmesser: 180 μm , Geschwindigkeit: 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Energie von 0,20-0,25 mJ.

Die Anwendung und Effektivität des gedruckten internen Standards ist in Abbildung 24 gezeigt. Zu diesem Zweck wurden fünf Rechtecke mit einer Fläche von 9 mm^2 gedruckt. Dies entspricht der Fläche einer typischen Proteinbande. Der Druck erfolgte mit einer 10-50%igen Druckdichte und einer mit Praseodym-versetzten Tinte(simuliert den Analyten). Nach Trocknungsphase wurde eine Indium-versetzte Tinte als interner Standard über die gesamte Membran gedruckt. Die simultane LA-ICP-MS Detektion des gewählten Analyten Praseodym und des internen Standards Indium ermöglicht eine einfache Normierung der Analytsignale auf den internen Standard. Jedes gemessene Indium-Signal wird auf den Mittelwert aller Indiummessungen normiert, so dass eine neu kalkulierte Indium-Intensität entsteht, die um den Zahlenwert von Eins schwankt ($In [cps]/\overline{In} [cps]$). Die Rohdaten der Praseodym-

Intensität werden anschließend durch die normierte Indium-Intensität dividiert ($\text{Pr}[cps]/(\text{In}[cps]/\overline{\text{In}}[cps])$, siehe Abbildung 24 (B)).

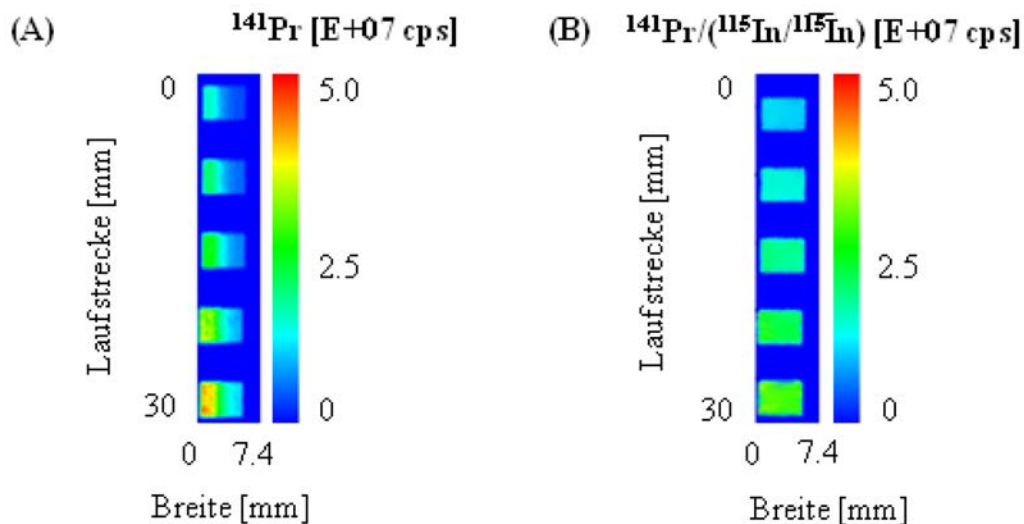


Abbildung 24 Zeigt die Intensitätsschwankungen von fünf gedruckten Rechtecke mit einer Praseodym-versetzten Tinte (^{141}Pr), sowie die Kompensation der Schwankungen durch einen gedruckten Internen Standard (^{115}In). Laserparameter: Spotdurchmesser: $180\text{ }\mu\text{m}$, Geschwindigkeit von $200\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Energie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Das 2D Intensitätsprofil der Abbildung 24 A (links) zeigt die Pr-Signalintensität mit steigender Druckdichte der fünf Rechtecke, sowie Schwankungen der Pr-Intensität in dem Intensitätsprofil von links nach rechts. Nach Anwendung des internen Standards kann eine homogene Verteilung der Pr-Intensitäten in allen gedruckten Rechtecken gezeigt werden (siehe Abbildung 24 B). Es konnte somit eine erfolgreiche Normierung durch die Anwendung des internen Standards, für die gedruckten Rechtecke nachgewiesen werden.

3.4.2 Entwicklung eines Kalibrierstandards

Die in den oberen Abschnitten beschriebenen Versuche zeigen wie reproduzierbar und homogen die Drucktechnik mit einem kommerziell erhältlichen Tintenstrahldrucker ist. Damit ist diese Technik zur internen Standardisierung der LA-ICP-MS Detektion geeignet. In den folgenden Experimenten soll die Anwendung der Drucktechnik, für die Element-Kalibrierung von Western Blot Assays in einer LA-ICP-MS Analyse, gezeigt werden.

3.4.2.1 Linearität des gedruckten Kalibrierstandards für die LA-ICP-MS

Für die Kalibrierung von Western Blot Membranen, bzw. Western Blot Immunoassays, wurden sechs Rechtecke, mit einer 10-60%igen Druckdichte, als Verdünnungsreihe der Originaltinte auf eine NC-Membran aufgebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die farbliche Abstufung der Rechtecke, bzw. die resultierende Konzentrationsreihe, an die Analytkonzentration angepasst wurde. Die Kalibrierung muss ausreichende Nachweisgrenzen und eine gute Genauigkeit, für das zu untersuchende analytische Element aufweisen. Für eine gute Matrixanpassung wurde der Kalibrierstandard auf einen proteinfreien Bereich der Western Blot Membran gedruckt (siehe Abbildung 25). Die Anwendung des Kalibrierstandards kann nur durch eine vorherige ICP-MS zur Quantifizierung des Metallgehalts pro gedrucktem Karo in einer Lösung erfolgen, so dass eine einfache absolute Quantifizierung von Metallen in Proteinspots, durch die Anwendung des gedruckten Kalibrierstandards, mittels LA-ICP-MS, ermöglicht wird. Bei diesen Experimenten sollen mehrere Metalle, gekoppelt an Proteine oder Antikörper in einem Multiplex-Ansatz simultan via LA-ICP-MS quantifiziert werden (siehe Abbildung 22, Abbildung 28). Bevor der Kalibrierstandard für komplexere Proben angewendet wurde, erfolgte die Überprüfung der Linearität des Standards.

Dafür wurde eine Erbium- und Praseodym-versetzte Tinte (50 mg L^{-1}) verwendet, da diese Elemente für die Detektion der markierten Proteine und Antikörper eingesetzt werden sollten. Mit der *LA-multi-Ln-Ink* wurde eine Verdünnungsreihe von sechs Rechtecken (9 mm^2) mit einer Druckdichte von 10-60% gedruckt. In Vorversuchen konnte für die Druckdichten von 10-60% ein guter linearer Bereich ermittelt werden (siehe Anhang: Abbildung 62). Nach der Trocknungsphase wurde die mit Indium-versetzte Tinte als interner Standard mit einer Druckdichte von 20% über die gesamte Membran gedruckt. Nach vollständiger Ablation der Membran wurden die detektierten LA-ICP-MS Daten auf den internen Standard normiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 25 in Form von 2D Intensitätsprofilen dargestellt.

Für die beiden Elemente konnten hohe normierte Intensitäten im Bereich von 10^6 bis 10^7 cps, sowie eine hervorragende lineare Korrelation zwischen Druckdichte und Signalintensität für die LA-ICP-MS (siehe Anhang: Abbildung 63) detektiert werden. Der gedruckte Standard erfüllte die Kriterien einer homogenen Bedruckung.

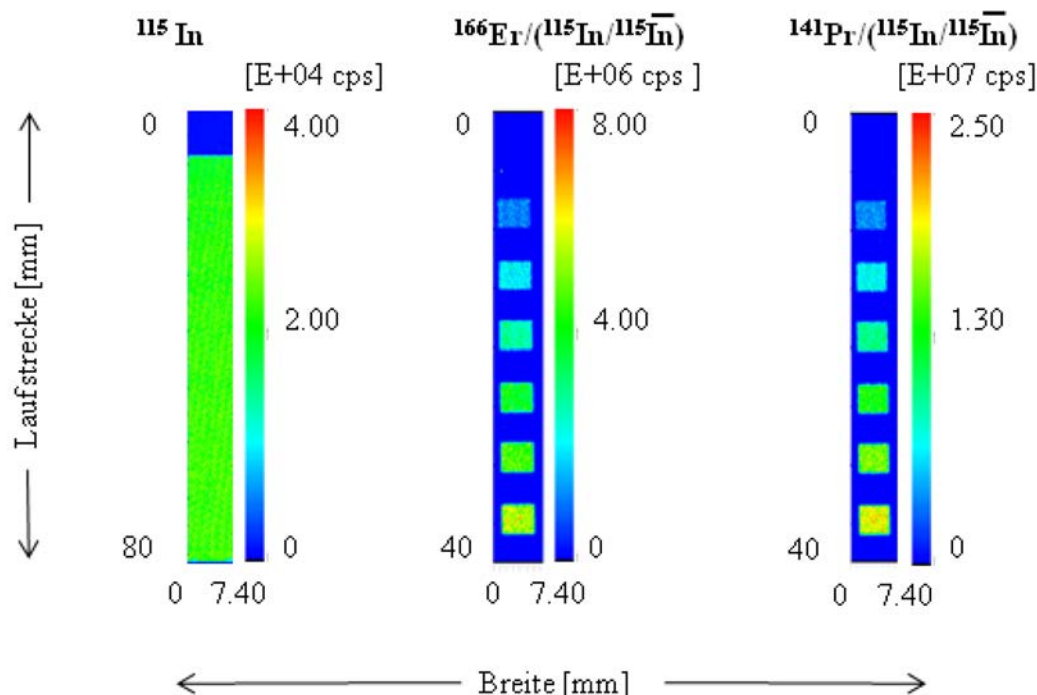


Abbildung 25 Intensitätsprofil des internen Standard (In) und Indium-normalisierte Intensitätsprofile der gedruckten Kalibrierstandards (*LA-multi-Ln-Ink*: ^{166}Er , ^{144}Pr -ink: 50 mg L^{-1}) und des internen Standards (*LA-In-Ink*: 4 mg L^{-1}). Die Detektion der Standards erfolgte simultan mit einer Laserspotgröße von $180 \text{ }\mu\text{m}$, Laserscangeschwindigkeit von $200 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von $0,20\text{-}0,25 \text{ mJ}$ ($\overline{\text{In}}$: $[\text{In [cps]}] / \overline{\text{In [cps]}}$).

3.4.2.2 Analytische Bewertung der gedruckten Kalibrierstandards

Für die Anwendbarkeit des Kalibrierstandards musste mittels ICP-MS Analyse von Lösungen, der Metallgehalt pro gedrucktem Karo quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde der Kalibrierstandard in doppelter Ausführung auf einen proteinfreien Bereich der Blot Membran, ohne internen Standard, gedruckt. In einem weiteren Schritt wurden die Rechtecke ausgeschnitten, mit einer 3,5% HNO_3 Lösung mit 50 ng L^{-1} Indium aufgelöst und mittels ICP-MS quantifiziert (siehe Abschnitt 5.1.1.2). Die Ergebnisse der quantifizierten Rechtecke zeigten einen ähnlichen linearen Zusammenhang zwischen Signalintensitäten und den eingesetzten Druckdichten (siehe Anhang: Abbildung 64) und bestätigt die in Kapitel 3.4.2.1 detektierten LA-ICP-MS Daten. Durch die Kombination der detektierten Daten aus der LA-ICP-MS und der ICP-MS von Lösungen für die gedruckte Kalibrierreihe kann eine

lineare Kalibrierkurve mit den Signalintensitäten (LA-ICP-MS), in Abhängigkeit von der quantifizierten Metallmenge (ICP-MS), pro Karo erzeugt werden, um als Kalibrierverfahren für Western Blot Membranen eingesetzt zu werden. Auf der y-Achse wurden die normierten Signalintensitäten (counts) der LA-ICP-MS und auf der x-Achse, die mittels ICP-MS quantifizierten Metallmengen (pmol) pro Karo, mit unterschiedlichen Druckdichten als Lösung aufgetragen (siehe Abbildung 26).

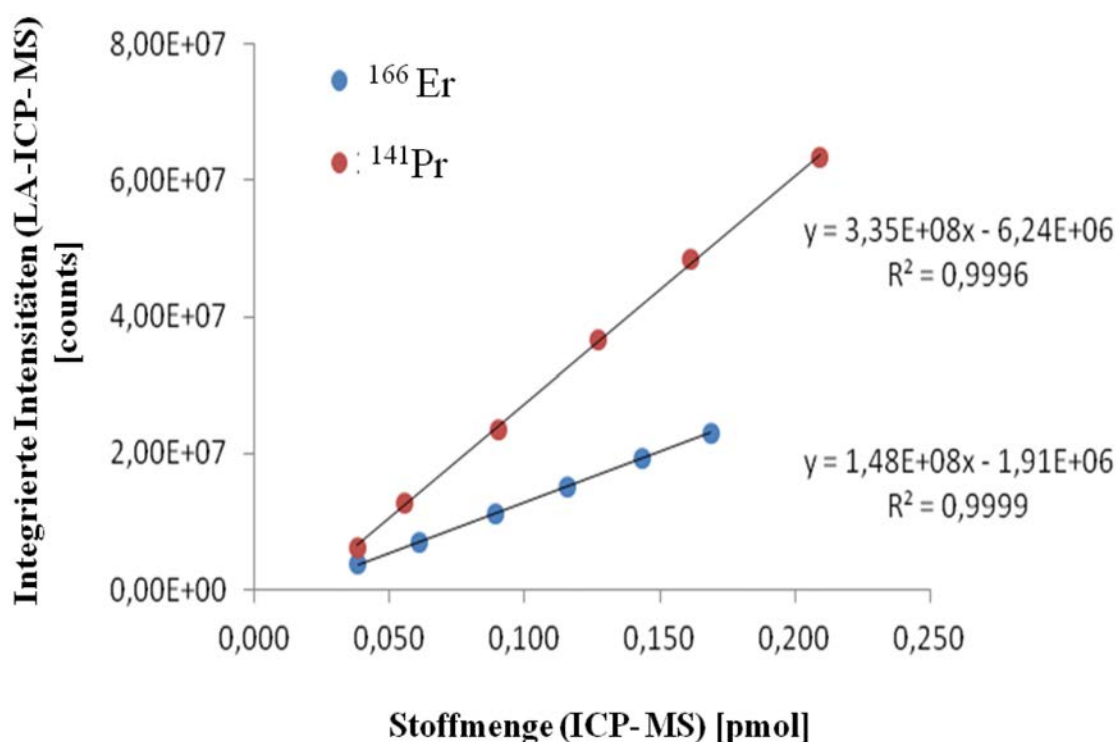


Abbildung 26 Zeigt die Kalibriergerade aus der Kombination der beiden ICP-MS Detektionen. Die normierten Signalintensitäten (counts) der LA-ICP-MS Detektion der festen Proben vs die ICP-MS quantifizierten Metallmengen (pmol) pro Karo als Lösung.

Durch Variation der Druckdichte konnte ein linearer Bereich innerhalb einer Größenordnung von 10^7 erzeugt werden. Es konnte eine absolute Metallmenge pro Karo in dem Kalibrierbereich von 40 bis 200 fmol detektiert werden. Die Ergebnisse zur analytischen Bewertung der linearen Kalibriergeraden sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Die Steigungen der Kalibriergeraden sind sehr hoch und betragen für Erbium $1,48 \times 10^8$ [counts \cdot pmol $^{-1}$] und für Praseodym $3,35 \times 10^8$ [counts \cdot pmol $^{-1}$]. Die analytischen Kenngrößen zur Bewertung der gedruckten Kalibrierstandards, wie das Bestimmtheitsmaß von $> 0,999$, die Nachweisgrenzen (NWG) von $\leq 3,6$ fmol und die relativen

Verfahrensstandardabweichungen von 1%, belegen die Robustheit der Methode. Für ein Protein mit einer einzelnen MeCAT-Modifikation und einem angenommenen Molekulargewicht von 50 kDa würde die absolute Nachweisgrenze 0,2 ng betragen.

Tabelle 5 Zusammenfassung der analytischen Kenngrößen zur Bewertung der gedruckten Kalibriereihen.

50 mg L ⁻¹ Tinte	¹⁶⁶ Er	¹⁴¹ Pr
Steigung [counts/ pmol]	1.48E+08	3.35E+08
y-Achsenabschnitt [counts]	-1.91E+06	-6.24E+06
Bestimmtheitsmaß	0.99987	0.99959
Reststreuung (y-SD) [counts]	7.47E+04	4.05E+05
Verfahrensstandardabweichung (VSD) [fmol]	0.50	1.21
Relative VSD [%]	1	1
Nachweisgrenze (NWG) [fmol]	1.50	3.6

Die berechneten statistischen Daten, sowie die niedrigen Nachweisgrenzen der neuen Drucktechnik zur Kalibrierung, sind sehr vielversprechend für die direkte Metallquantifizierung von Membranen und Immunoassays via LA-ICP-MS. Die Kalibrierungstechnik berücksichtigt die herkömmlichen biochemischen Arbeitstechniken und wird erst nach der Probenvorbereitung aufgedruckt, so dass eine einfache Handhabung für komplexe Proben erfolgen kann. Dies wird im nächsten Abschnitt detailliert beschrieben.

Bei einer unbekannten Proteinprobe (z.B. Metallo-Proteine) muss die Signalintensität der enthaltenen Metalle zunächst bestimmt werden, um die Signalintensität, bzw. die Konzentration der Metalle der Kalibrierreihe festzulegen, gegebenenfalls durch entsprechende Verdünnungsschritte der Ausgangstinte.

3.4.3 Anwendungsprinzip des Standardisierungs- und Quantifizierungs-Konzeptes für Western Blot Membranen

In diesem Abschnitt sollen die zuvor entwickelten Standardisierungsmethoden für die LA-ICP-MS Analyse an einem Western Blot Immonoassay angewendet werden. Zu diesem Zweck wurde ein Versuchsmodell für zwei unterschiedliche Anwendungen in einem *Proof-of-principle Versuch* entwickelt, um den gedruckten internen Standard und den Kalibrierstandard auf einer Blot Membran anzuwenden. Die zwei unterschiedlichen Anwendungen sind gegliedert in einen direkten Nachweis und einem indirekten Nachweis. Die beiden Ansätze wurde in den Abbildung 27, Abbildung 28 schematisch dargestellt.

Sie zeigen die komplexen Arbeitsschritte der Probenvorbereitung und die anschließende neue Standardisierung.

Der direkte Ansatz ist repräsentativ für die Detektion von allen Metallen in Proteinen auf Blot Membranen, Mikroarrays oder in Gewebeschnitten. Zur Nachahmung von metallhaltigen Biomolekülen wurden drei MeCAT(¹⁶⁶Er)-modifizierte, geblottete Proteine (Rinderserumalbumin (BSA), Ovalbumin und Lysozym) mit unterschiedlichen Molekularmassen eingesetzt (siehe Abbildung 27-1, Spur A).

Der indirekte Ansatz steht für alle Arten von Immunoassays, in diesem Fall wurden MeCAT(¹⁴¹Pr)-modifizierte Antikörpern-Antigen-Konjugate nach immunologischer Reaktion untersucht (siehe Abbildung 27-1, Spur B). Die beiden Spuren A (direkter Ansatz) und B (indirekter Ansatz) wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 27-1) und anschließend per Western Blot auf die Oberfläche einer NC-Membran immobilisiert (Abbildung 27-2). In einer Immunreaktion wurde die Membran mit einem MeCAT(¹⁴¹Pr)-modifizierten Antikörper inkubiert (Abbildung 27-3), so dass die Membran MeCAT(¹⁴¹Pr)-modifizierte Antikörper-Antigen Konjugate (indirekter Ansatz) und die MeCAT(¹⁶⁶Er)-modifizierten Proteine (direkter Ansatz) trägt.

Die Aufbringung der Kalibrierstandards und internen Standardisierung erfolgte erst nach der Probenvorbereitung und ist schematisch in Abbildung 28-1/2 gezeigt. Diese Studie führte zur Entwicklung der zwei Laser Ablation-ink Kit Produkte (*LA-Ink 1*, und *LA-multi-Ln-Ink 2*) der Proteome Factory.

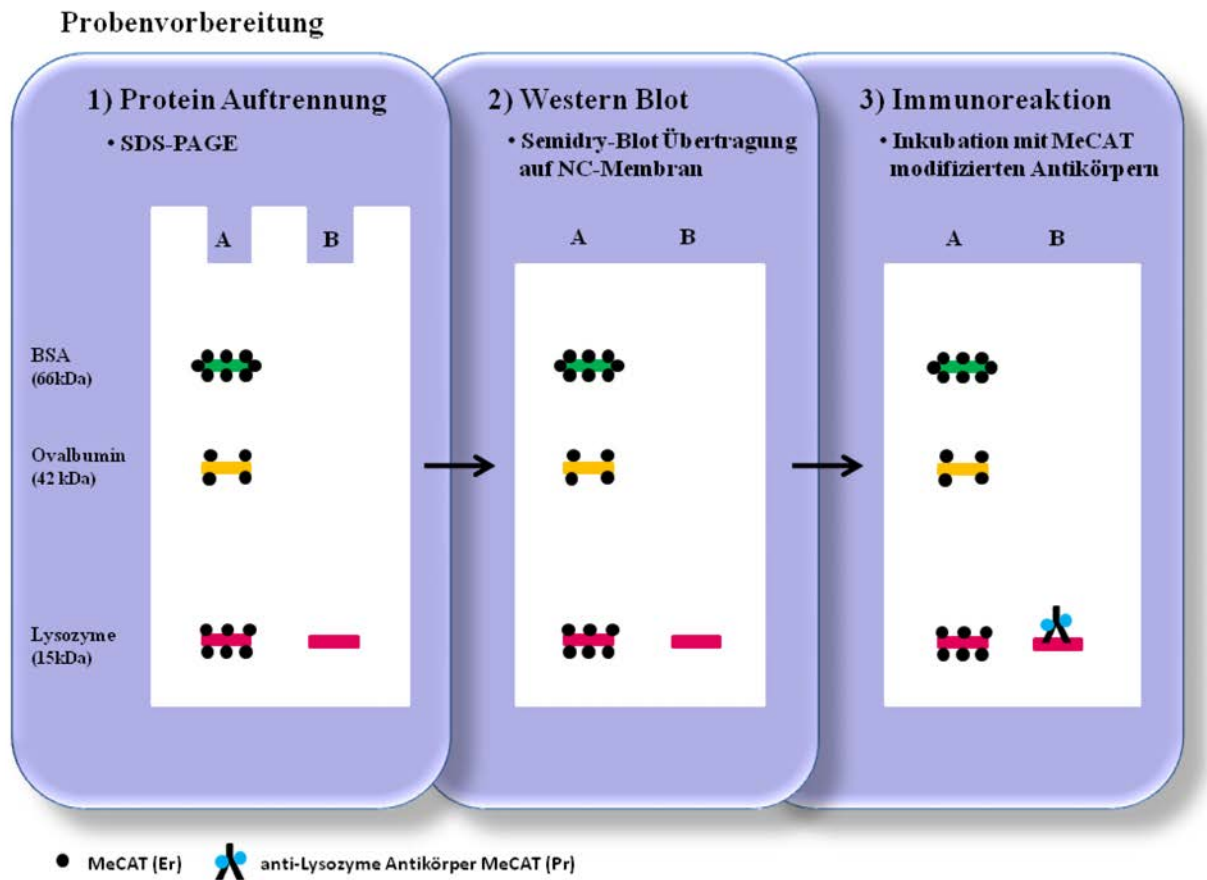


Abbildung 27 Zeigt die biochemischen Arbeitsschritte für den Western Blot Immunoassay. Die elektrophoretische Auftrennung von zwei unterschiedlichen Proben in einer SDS-PAGE ist links in der Abbildung 27-1 gezeigt. Spur A: MeCAT(^{166}Er)-modifiziertes Proteingemisch; Spur B: Lysozym als Antigen. In der Mitte (Abbildung 27-2) ist die elektrophoretische Übertragung des aufgetrennten Proteingemisches auf eine NC-Membran dargestellt. Rechts in der Abbildung 27-3 ist die Immunreaktion zwischen MeCAT(^{141}Pr)-modifiziertem Antikörper und Antigen gezeigt.

Für die Kalibrierung wurden 6 Quadrate (9 mm^2) mit einer 10-60%igen Druckdichte als Verdünnungsreihe mit einer Erbium und Praseodym-versetzten Tinte (*LA-multi- ^{166}Er , $^{141}\text{Pr-Ink}$*) auf einen proteinfreien Bereich der NC-Membran gedruckt (siehe Abbildung 28-1). Die Erbium und Praseodym Kalibrierreihen wurden zur Quantifizierung der MeCAT(^{166}Er)-modifizierten Proteine und der MeCAT(^{141}Pr)-modifizierten Antikörper-Antigen-Konjugate eingesetzt. Nach Trocknung des Kalibrierstandards wurde die gesamte Membran mit einer Indium-versetzten Tinte (*LA-In-Ink*) und einer 20%igen Druckdichte bedruckt (siehe Abbildung 28-2).

Für die Anwendung der neuen Drucktechnik wurde der Analyt (MeCAT(^{141}Pr)-modifizierte Konjugate, MeCAT(^{166}Er)-modifizierte Proteine) und die Standards (Kalibrierstandard,

interner Standard) vollständig in mehreren Linienscans (siehe Kapitel 2.1.3), unter gleichen Detektionsbedingungen (Laserenergie, Laserspotgröße und Laserscangeschwindigkeit) abgetragen.

Aufbringung der gedruckten Standards

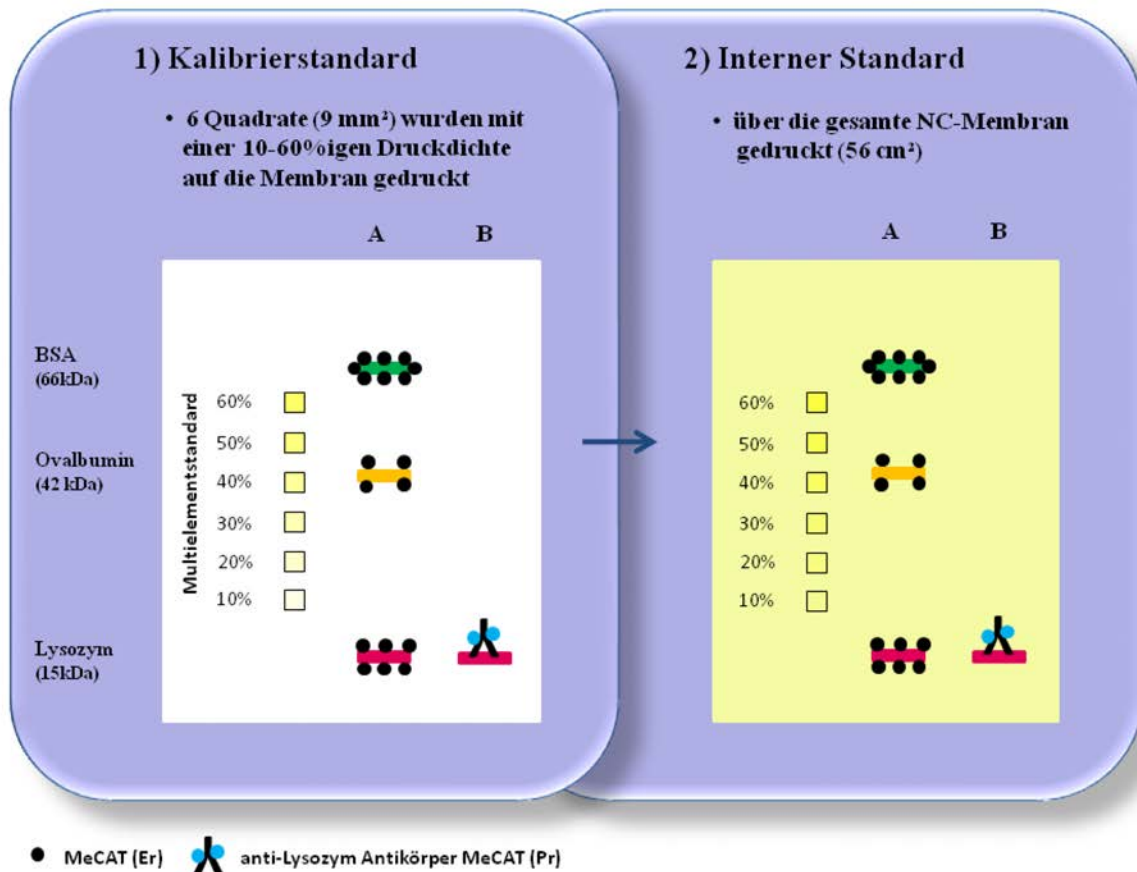


Abbildung 28 Schematische Darstellung der Kalibrierung (Abbildung 28-1) und internen Standardisierung (Abbildung 28-2) eines Western Blot Immunoassays. Für den *Proof-of-Principle* Versuch wurden die Proteine auf einer NC-Membran immobilisiert (siehe Abbildung 27). Nach immunologischer Reaktion wurden 6 Quadrate mit einer *LA-multi-Ln-Ink* und einer 10-60%igen Druckdichte als Kalibrierstandard (Abbildung 28-1) auf die NC-Membran gedruckt. In einem zweiten Schritt (Abbildung 28-2) wurde der interne Standard mit der *LA-In-Ink* und einer 20%igen Druckdichte über die gesamte Membran gedruckt (gelbe Bereich).

Um zu zeigen, dass die Anwendung des internen Standards und Kalibrierstandards für die LA-ICP-MS geeignet ist, wurden alle Messungen durch die ICP-MS Analyse von Lösungen parallel quantifiziert.

3.4.3.1 Bestimmung der durchschnittlichen Markierungsgrade der MeCAT-modifizierten Proteine

Drei Standardproteine wurden unter physiologischen Reaktionsbedingungen, nach Standardmarkierungsprotokoll für Antikörper, mit MeCAT teilmodifiziert (siehe Material und Methoden 5.2). Die drei Standardproteine BSA, Lysozym und Ovalbumin besitzen 35, 9 und 6 Cysteine, die für eine MeCAT-Markierung zur Verfügung stehen. Die Proteine wurden ausgewählt um einen Molekularbereich von 21 bis 100 kDa bzw. eine große molekulare Verteilung auf der Blot Membran abzudecken. Mit dem standardisierten Markierungsprotokoll für Antikörper konnten die Modellproteine bis zu 55% der theoretisch zur Verfügung stehenden SH-Gruppen mit MeCAT-modifiziert werden. In dem *Proof-of-principle* Experiment wurde das MeCAT-modifizierte Proteingemisch elektrophoretisch getrennt und auf eine Western Blot Membran übertragen, um kleine Proteinbanden nahe der NWG zu erzeugen. Durch die kovalente Bindung der MeCAT-Reagenzien kann es nicht zu Verlusten des Metallmarkers während der elektrophoretischen Auftrennungen kommen [56, 159]. Der durchschnittliche Markierungsgrad für die drei Standardproteine ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

3.4.3.2 LA-ICP-MS Quantifizierung der MeCAT-modifizierten Proteine nach Western Blotting

Für die drei Modellproteine konnten folgende Metallmengen mittels LA-ICP-MS und ICP-MS im Vergleich ermittelt werden (siehe Tabelle 6): 0,52 pmol Er für BSA, für Ovalbumin 0,06 pmol Er, und für Lysozym 0,10 pmol Er. Die Ergebnisse der LA-ICP-MS Untersuchungen resultierten aus einer Doppelbestimmung, da die Reproduzierbarkeit der Drucktechnik bereits in vorherigen Versuchen mit einem RSD von 1-2% bestätigt wurde (siehe Anhang: Tabelle 29). Zur Sicherstellung einer homogenen und reproduzierbaren Auflösung der Membranstücken wurde die ICP-MS Messung der Lösungen in fünf Wiederholungen mit einem RSD von 5-8% durchgeführt (siehe Anhang: Tabelle 31).

Die LA-ICP-MS Quantifizierung der MeCAT(¹⁶⁶Er)-modifizierten Proteine (direkte Nachweis, siehe Kapitel 3.4.3) konnte mittels ICP-MS Detektion von Lösungen bestätigt werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Vergleich zweier Quantifizierungskonzepte für die LA-ICP-MS und der ICP-MS.

	BSA (Rind)	Ovalbumin (Huhn)	Lysozym (Huhn)
durchschnittlicher Markierungsgrad (Metall pro Protein) MeCAT(Ln)	18,8 ¹⁶⁶ Er	3,3 ¹⁶⁶ Er	4,8 ¹⁶⁶ Er
n (Protein-Er) pro Spur der SDS-PAGE [pmol]	14,50	14,50	14,50
Kalibriergerade: LA-ICP-MS (50 mgL⁻¹ Tinte; ¹⁶⁶Er)	$y = 1,48E+08 \times -1,91E+06; (R^2=0,9999)$		
n (¹⁶⁶Er) LA-ICP-MS [pmol]	0,52	0,06	0,10
n (Protein) [pmol]	0,028	0,018	0,021
Kalibriergerade: ICP-MS (Multielementstan.; ¹⁶⁶Er)	$y = 5,04E+06 \times -2,02E+03; (R^2=0,9999)$		
n (¹⁶⁶Er) ICP-MS [pmol]	0,42	0,05	0,12
n (Protein) [pmol]	0,022	0,016	0,025

Durch die Kombination der Metallquantifizierung der geblotteten Proteine mittels LA-ICP-MS und der bestimmten Markierungsgrade mittels ICP-MS Analyse von Lösungen in Kombination mit den eingesetzten Proteinmengen, war es uns möglich die exakte Proteinmenge auf der Membran zu ermitteln. Die bestimmte Proteinmenge aus dem Experiment ist wesentlich geringer als die bei der SDS-PAGE aufgetragene Proteinmenge (siehe Tabelle 6). Dieser Proteinverlust war zu erwarten, da durch den Western Blot die Protein-Übertragung, unvollständig ist. Der Proteinübertragungsgrad ist abhängig von dem eigentlichen Molekulargewicht des Proteins. Für diese Untersuchungen wurden mittlere Blot Bedingungen gewählt, um eine Übertragung von Proteinen in dem Molekularbereich von 21 bis 100 kDa abzudecken. Diese Herangehensweise kann eine gute Methode zur Ermittlung von Proteinverlusten darstellen, wurde aber in der vorliegenden Forschungsarbeit nicht weiter verfolgt. Unabhängig von den Proteinverlusten konnte das Druckkonzept zur Quantifizierung von MeCAT-modifizierten Proteinen erfolgreich angewendet und mittels ICP-MS Analyse von Lösungen validiert werden.

Die einfache Anwendung des gedruckten Standards nach der Probenaufarbeitung bei komplexen biochemischen Arbeitsabläufen ist für die Quantifizierung von MeCAT-modifizierten Proteinen (direkten Ansatz) mittels LA-ICP-MS erfolgreich gezeigt worden.

3.4.3.3 LA-ICP-MS Quantifizierung von MeCAT-modifizierten Antikörper-Konjugaten auf einer NC-Membran

Nach erfolgreicher Evaluierung der Drucktechnik zur Quantifizierung von MeCAT-modifizierten Proteinen nach Western Blotting (direkte Nachweis, siehe Abschnitt 3.4.3, 3.4.3.2), erfolgt in diesem Abschnitt die Anwendung für den indirekten Ansatz um MeCAT-modifizierte Antikörper-Konjugate nach einer Immunoreaktion zu quantifizieren (siehe Abbildung 27, Abbildung 28). Dafür wurden Lysozymbanden nach einer SDS-PAGE, elektrophoretisch auf eine NC-Membran übertragen und mit MeCAT(^{141}Pr)-modifizierten anti-Lysozym-Antikörpern inkubiert (indirekte Nachweis, siehe 3.4.3). Nach reversibler Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Ponceaus S wurde die Hälfte der Banden ausgeschnitten, aufgelöst und mittels ICP-MS Analyse von Lösungen, zum Vergleich detektiert. Die andere Hälfte der Proteinbanden wurde unter Verwendung der gedruckten Standards für die LA-ICP-MS Detektion eingesetzt. Insgesamt wurden je sechs Proteinbanden mit der ICP-MS Analyse von Lösungen und mit der LA-ICP-MS detektiert. Die Ergebnisse beider ICP-MS Detektionen sind in der Tabelle 7 gegenübergestellt.

Tabelle 7 Vergleich der Praseodym Quantifizierung via LA-ICP-MS und ICP-MS von MeCAT-modifizierten Antikörper-Antigen-Konjugaten auf einer NC-Membran.

	ICP-MS	LA-ICP-MS
Spur 1 [pmol ^{141}Pr]	0,104	0,102
Spur 2 [pmol ^{141}Pr]	0,111	0,103
Spur 3 [pmol ^{141}Pr]	0,102	0,102
Spur 4 [pmol ^{141}Pr]	0,093	0,100
Spur 5 [pmol ^{141}Pr]	0,111	0,109
Spur 6 [pmol ^{141}Pr]	0,116	0,112
Mittelwert [pmol ^{141}Pr]	0,106	0,105
SD [pmol ^{141}Pr]	0,008	0,005
RSD [%]	8	5
Kalibriergerade LA-ICP-MS (50 mg L ⁻¹ Tinte; ^{141}Pr)	$y = 3,35\text{E}+08 \times -6,24\text{E}+06$; ($R^2 = 0,9996$)	
Kalibriergerade ICP-MS von Lösungen (Multielementstandard)	$y = 1,04\text{E}+05 \times -6,80\text{E}+03$; ($R^2 = 0,9999$)	

Für beide Ansätze konnten ähnliche absolute Praseodymmengen, um 0,1 pmol bestimmt werden. Die ICP-MS Analyse der flüssigen Proben erzielte eine RSD von 8% und die LA-ICP-MS lieferte einen RSD von 5% für die je sechs identische, MeCAT(^{141}Pr)-modifizierten Antikörper-Antigen-Konjugate. Im direkten Vergleich der beiden Ansätze kann eine prozentuale Abweichung der absoluten Praseodymmenge von etwa 1% bestimmt werden, was als überraschend gut bewertet werden kann. Durch die vorherige Bestimmung des durchschnittlichen Markierungsgrades der Antikörper (MeCAT(^{141}Pr) anti-Lysozym-

Antikörper = 3,14) könnte man die Anzahl der gebundenen Antikörper pro Antigen über die absolute Pr Menge einfach kalkulieren. Die Optimierung der MeCAT-Modifikation (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) zeigt, dass viele Antikörperfragmente durch die Modifikation entstehen und MeCAT-Modifikation tragen. L. Mueller *et al.* [160] zeigte zusätzlich, dass auch die MeCAT-modifizierten Antikörperfragmente mit dem Antigen binden, so dass eine Korrelation von Metallgehalt zu gebundenem Antigen nicht möglich ist. Daher wurde in allen weiteren Versuchen darauf verzichtet, den durchschnittlichen Markierungsgrad der eingesetzten Antikörper jeweils neu zu bestimmen.

3.5 Anwendung des Standardisierungskonzeptes für Gewebeschnitte

3.5.1 Einleitung

Nach Überprüfung der Drucktechnik zur Standardisierung von LA-ICP-MS Analysen am Beispiel einer Western Blot NC-Membran als Matrixanpassung [161] wurde diese Technik auch für Gewebeschnitte immobilisiert auf einem Objektträger getestet. Dafür wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein-Antikörper mit dem Synonym Her2 (Rezeptor für humane Wachstumsfaktoren) [162] mit MeCAT(¹⁶⁵Ho)-modifiziert und an Gewebeschnitten vom Typ Mammakarzinom in einer immunologischen Reaktion eingesetzt, um die Standardisierung der Drucktechnik zu erproben. Die Untersuchungen erfolgten immer an Her-2, positivem und negativem Brustgewebe. Die interne Standardisierung der LA-ICP-MS Detektion von dünnen Gewebeschnitten sollte hier eingesetzt werden um Schwankungen während des Laserabtrages und Materialtransportes, sowie generelle instrumentelle Schwankungen, zu kompensieren. Zur internen Standardisierung wurde wieder das Element Indium eingesetzt (siehe Kapitel 3.4). Eine bereits beschriebene interne Standardisierung ist die Iodierung von Gewebeschnitten, wie sie bereits von Giesen et al. [28] vorgestellt wurde.

Diese Standardisierung basiert auf einer homogenen, chemischen Modifikation von Aminosäuren, wie zum Beispiel Tyrosin und Histidin [163], von Proteinen in Gewebeschnitten, um die Dicke der Gewebeschnitte, bzw. die Schwankung des Laserabtrags während einer Analyse zu kompensieren. Diese Kompensation wurde bisher nur unter optimierten Detektionsbedingungen mit einer Laserspotgröße von 200 µm und einer Laserscangeschwindigkeit von 200 µm s⁻¹ durchgeführt. Um eine allgemeingültige interne

Standardisierung ohne chemische Veränderung der Proben für eine große Anzahl an Laserspotgrößen und Laserscangeschwindigkeiten zu entwickeln, wurde ein interner Standard, in Anlehnung an Kapitel 3.4, homogen auf einen dünnen Gewebeschnitt aufgebracht, getestet und anschließend mit der beschriebenen Iod Standardisierung verglichen.

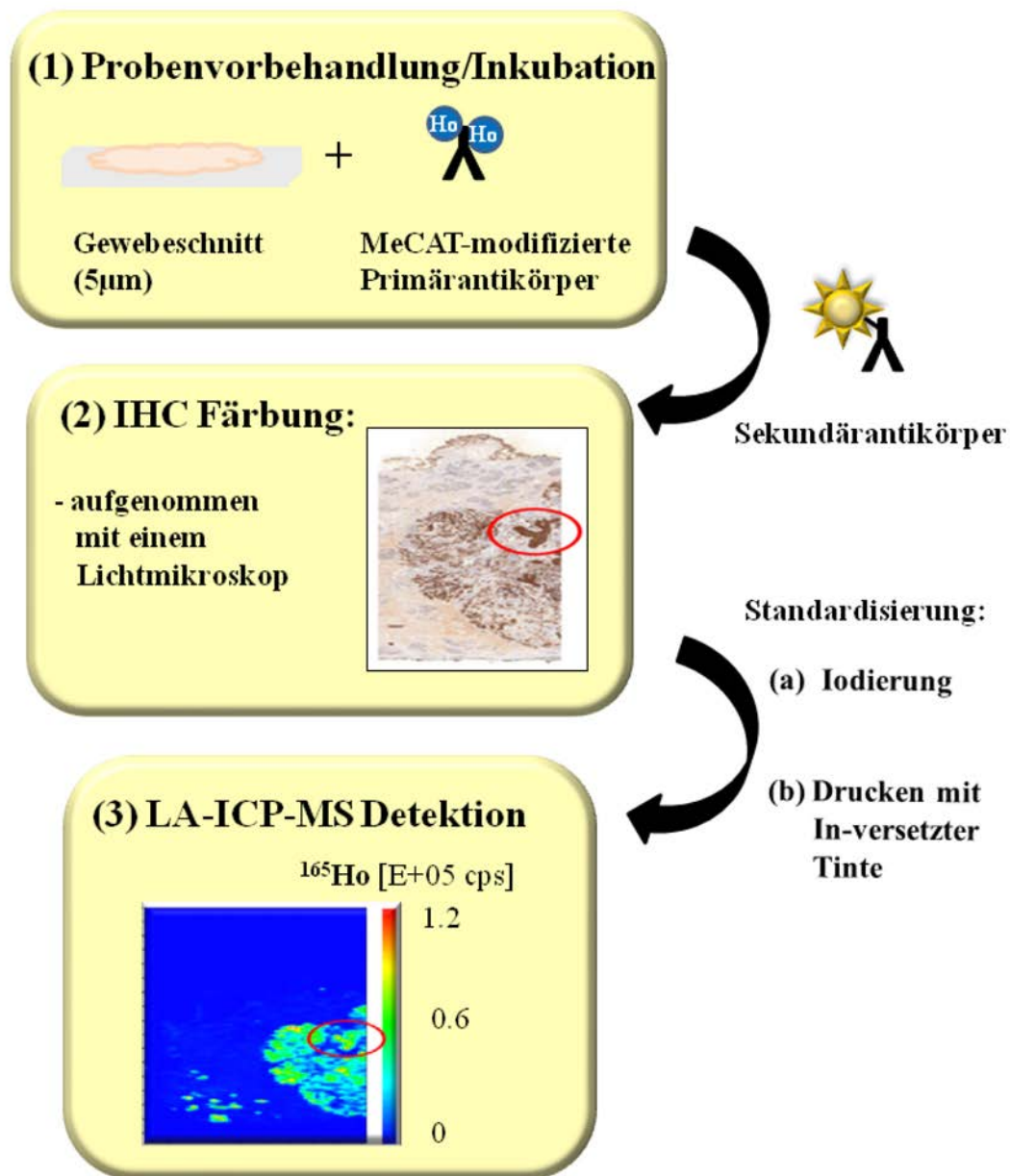


Abbildung 29 Schematischer Arbeitsablauf zur Detektion von MeCAT(^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörper in einem 5µm dicken Paraffin-eingebetteten Brustkrebsgewebeschnitt zum direkten Vergleich zweier Detektionsmethoden: LA-ICP-MS vs IHC-Färbung und zweier Standardisierungen: Iodierung vs gedrucktem Indium-Standard.

Die homogene, dünne Aufbringung einer Indium-versetzten Tinte, erfolgte dabei wie bisher mit einem kommerziellen Papier/CD-Tintenstrahldrucker. Dieser wurde ebenfalls für das Bedrucken der NC-Membran in Kapitel 3.4 eingesetzt. Für eine optimale Fixierung der Gewebeschnitte, wurde aus einer Daten-CD eine Halterung mit zwei Passvorrichtungen ausgefräst. Die interne Standardisierung von Gewebeschnitten wurde mit einer 20%igen Druckdichte einer Indium-versetzten Tinte, durch eine vollständige Bedruckung der Probe, getestet.

Zur Validierung der MeCAT-modifizierten Antikörper nach Immunreaktion, sowie der gedruckten internen Standardisierung, erfolgte durch eine immunohistochemische Färbung (IHC) (siehe Abschnitt 5.6.5). Um einen direkten Vergleich zwischen der LA-ICP-MS Visualisierung der modifizierten Antikörper-Antigen-Konjugate und der kommerziellen IHC-Färbung der Antikörper-Antigen-Konjugate zu erlangen, wurden für beide Nachweisverfahren die MeCAT-modifizierten Antikörper eingesetzt. Während die Visualisierung der modifizierten Antikörper-Antigen-Konjugate für die LA-ICP-MS über die Lanthanid-Modifikation erfolgte (Abbildung 29-1), wurde für die IHC-Färbung ein spezies-spezifischer Zweitantikörper zur Sichtbarmachung des Konjugates eingesetzt (Abbildung 29-2). Nach erfolgreicher Konjugation wurden die Gewebeschnitte zum Vergleich der Standardisierungen iodiert (Abbildung 29-A) und mit einer Indium-versetzten Tinte bedruckt (Abbildung 29-B).

Die Anwendung des gedruckten internen Standards auf das Probesignal, sowie die Berechnungen ($\text{Pr}[cps]/(\text{In}[cps]/\overline{\text{In}}[cps])$) sind in Kapitel 3.4.1.3 detailliert beschrieben.

3.5.2 Standardisierung für die LA-ICP-MS von Gewebeschnitten: Iod vs. Indium

In diesem Kapitel wird die Anwendung der Drucktechnik auf Gewebeschnitte zur internen Standardisierung (siehe Kapitel 3.4.1.3) der LA-ICP-MS Detektion eingesetzt, um reproduzierte 2D Intensitätsprofile mit einer hohen Bildauflösung und besserem Kontrast der Tumoreale zu erreichen. Der gedruckte interne Standard wird mit der Iodierung von Gewebeschnitten verglichen. Für einen direkten Vergleich wurden beide interne Standardisierungen parallel auf die Gewebeschnitte angewendet und mit der IHC-Färbung verglichen. Das Analysenschema ist in der Abbildung 29 zusammengefasst; in die

Entparaffinierung der Gewebeschnitte und Inkubation der MeCAT(^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörper ((1) Vorbehandlung/Inkubation, siehe Material und Methoden 5.6.6.1) und anschließende IHC-Färbung unter Verwendung von Sekundärantikörpern ((2) IHC-Färbung, Material und Methoden 5.6.6). Nach Charakterisierung der IHC-Färbung wurden die Gewebeschnitte iodiert und mit einer In-versetzten Tinte vollständig bedruckt, gefolgt von der LA-ICP-MS Detektion der Ho-, I- und In- Signalintensitäten. Die Abbildung 30 zeigt die erfassten Signalintensitäten für die beiden internen Standards für die LA-ICP-MS Detektion (B, C), sowie den IHC gefärbten Gewebeschnitt (A) und die berechneten Summen der Intensitäten der internen Standards über die Scanlaufstrecke (D).

Die Iodierung von Gewebeschnitten wurde bisher eingesetzt, um durch die gemessenen Iod-Signalintensitäten die Schwankungen in den Gewebeschichtdicken zu kompensieren. Mit Hilfe der Iodierung ist es möglich, unter Verwendung von Spotgrößen $< 200\mu\text{m}$, Gewebestrukturen in Abhängigkeit der Proteinkonzentration im Gewebeschnitt zu detektieren. Durch die Änderung der Laserparameter konnten die Tumorbereiche im Gewebeschnitt über das Iodsignal detektiert werden (siehe Abbildung 30). Da die Iodierung auf einer chemischen Modifikation von Aminosäuren (siehe Kapitel 3.5) basiert, entspricht die Iod-Signalintensität einer veränderten Proteinmenge im Gewebeschnitt.

Im direkten Vergleich der beiden 2D Intensitätsprofile (Abbildung 30(B vs C) sowie der Linienscans (Abbildung 30 (D)) zeigen sich hohe Signalschwankungen für Iod, hingegen können für Indium stabile Signale unabhängig von der Proteinkonzentration ermittelt werden. Folglich ist die Iodierung von Gewebeschnitten durch die Laserspotgröße bzw. Auflösung als interner Standard beschränkt. Der Linienscan des gedruckten internen Standards (Abbildung 30 (D)) zeigt nur niedrige Schwankungen des Indiumsignals, die wahrscheinlich von Matrix-Effekten und Geräteschwankungen resultieren [164].

Diese Ergebnisse konnten durch den Vergleich der berechneten RSD der Ho Signale für den gesamten Probenbereich des positiven und negativen Brustgewebeschnitts bestätigt werden. Wie erwartet zeigen sich Unterschiede in den Ho-Signalintensitäten des modifizierten Her2-Antikörper zwischen der positiven Tumorseite (\bar{x} (^{165}Ho): $8,80 \cdot 10^3$ cps, RSD: 80%) und der negativen Kontrolle (\bar{x} (^{165}Ho): $1,06 \cdot 10^3$ cps, RSD: 60%) da es in den positiven Tumorbereichen hohe Signalintensitäten gibt. Im Vergleich dazu zeigt der gedruckte interne Standard eine RSD von 30% in beiden Proben (negative Kontrolle: RSD: 29%, \bar{x} (^{115}In): $4,10 \cdot 10^4$ cps; positive Tumorseite: RSD 34%, \bar{x} (^{115}In): $5,79 \cdot 10^4$ cps) trotz

unterschiedlichen Probeneigenschaften, wie der Proteindichte oder der Gewebedicke. Der Indium gedruckte interne Standard zeigt eine sehr gute Empfindlichkeit und die Indiummenge kann mittels Druckdichte über die gesamte Oberfläche der Probe reguliert werden. Da der modifizierte Her2-Antikörper oberflächlich bindet, scheint eine Korrektur der Schichtdicke nicht notwendig (siehe Abschnitt 3.3.1).

Die relative Standardabweichung (RSD) als Faktor für die Signalschwankung ist für Iod (negative Kontrolle: RSD: 56%, \bar{x} (^{127}I): $1,30 \cdot 10^8$ cps; positive Tumorbereich: RSD 66%, \bar{x} (^{127}I): $5,98 \cdot 10^7$ cps) doppelt so hoch wie für Indium (negative Kontrolle: RSD: 29%, positive Tumorbereich: RSD 34%). Bei der bildgebenden LA-ICP-MS mit niedrigen Laserspotdurchmessern ($< 50\mu\text{m}$) und einer hohen Bildauflösung liefert der gedruckte interne Standard sehr gute Ergebnisse.

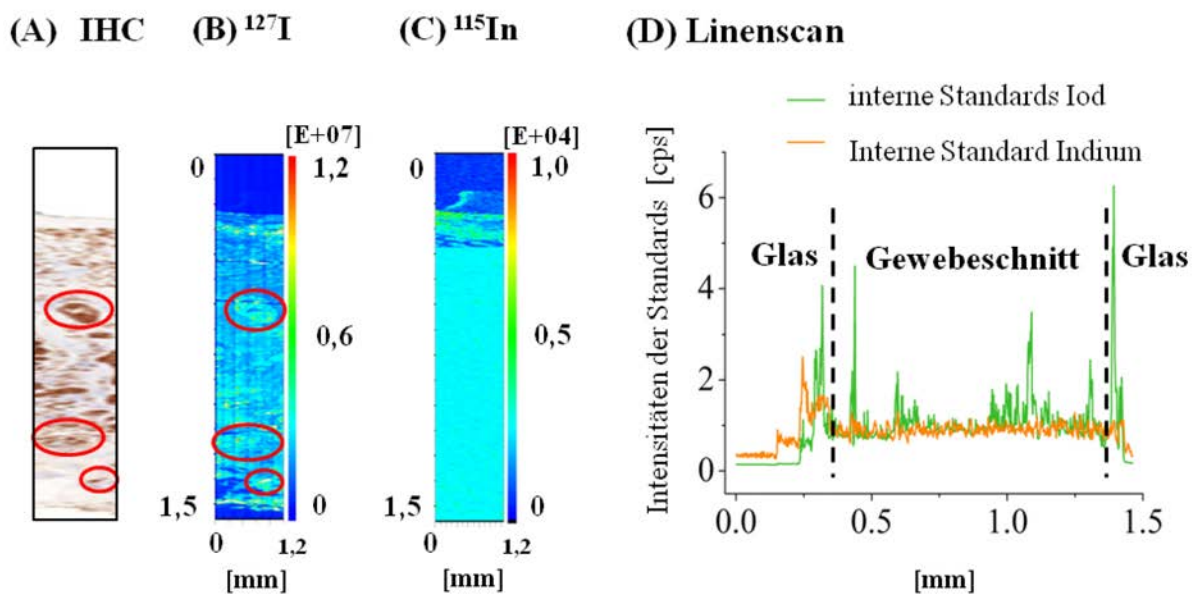


Abbildung 30 Zeigt das 2D Intensitätsprofil von Iod (B), In (C) und den entsprechenden IHC (A) gefärbte $5\mu\text{m}$ dünnen Brustgewebeschnitt der positiv für anti-Her2-Antikörper war. Die charakteristischen Tumorbereiche im Gewebe wurden für eine leichte Wiedererkennung zwischen IHC und 2D Intensitätsprofil mit einem roten Kreis gekennzeichnet. (D) Zeigt die berechneten Summen der Intensitäten der internen Standards über die Scanlaufstrecke. Laserparameter: Laserspotgröße von $50\mu\text{m}$, Laserscangeschwindigkeit von $50\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Durch weitere Varriierung der Druckdichte wäre es möglich eine noch bessere Auflösungen $< 30\mu\text{m}$ zu erzielen. Dafür werden derzeit Markierungsreagenzien mit höheren Signalintensitäten entwickelt. Weitere Versuche zur Verbesserung der Laserspotgröße wurden

nicht durchgeführt, da in diesem Bereich der Analyt bzw. der MeCAT(^{165}Ho)-modifizierte anti-Her2-Antikörper keine ausreichenden Signalintensitäten mehr aufweist.

Zur Bewertung der beiden Standards für das bildgebende LA-ICP-MS Detektionsverfahren von Her2-positivem Brustkrebsgewebe wurden die Iod- und Indiumsignale zur Normierung der Ho-Signalintensitäten eingesetzt. Die Berechnung der Normierung ist in Kapitel 3.4.1.3 detailliert beschrieben und erfolgte nach folgenden Gleichungen ($\text{Ho}[cps]/(\text{In}[cps]/\overline{\text{In}}[cps])$), ($\text{Ho}[cps]/(\text{I}[cps]/\overline{\text{I}}[cps])$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 31 zusammengefasst. Die Abbildung zeigt die (A) IHC-Färbung als Referenz zur Validierung, sowie die initialen (B) Ho-, (C) Indium-normierten Ho- und (D) Iod-normierten Ho- 2D Intensitätsprofile.

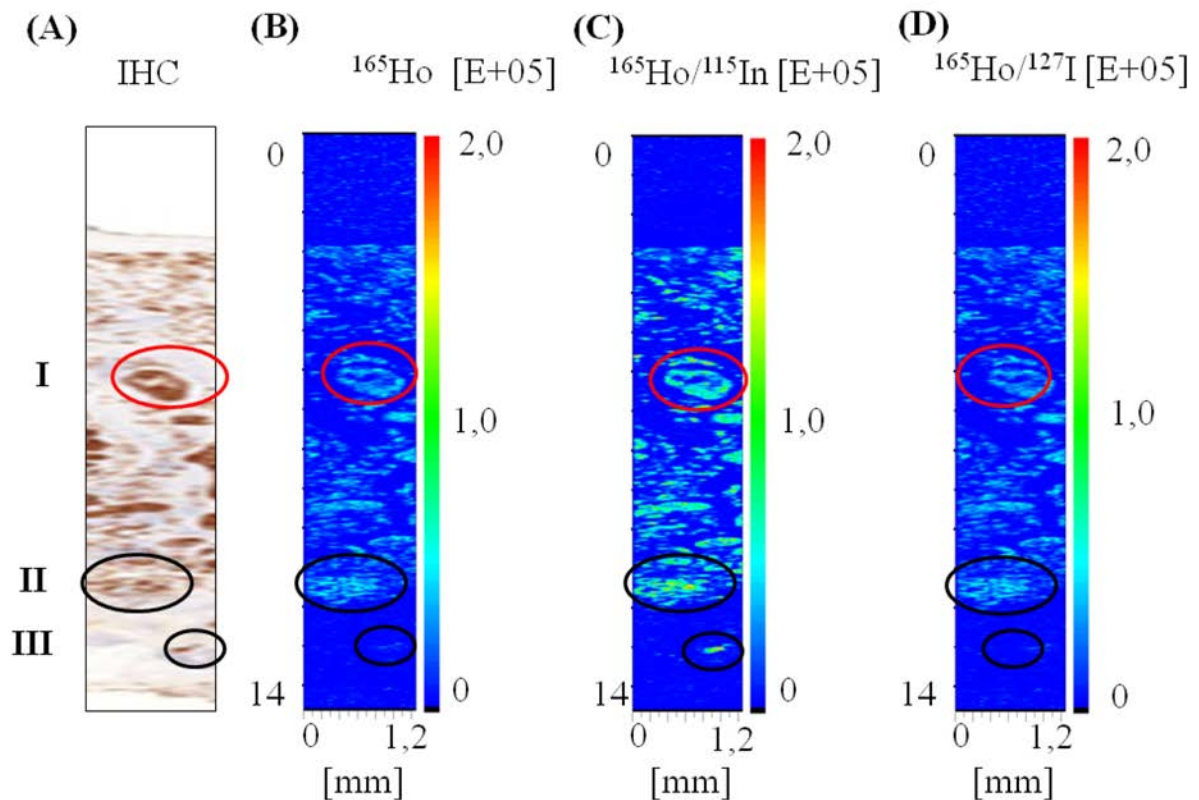


Abbildung 31 Zeigt 2D Intensitätsprofile eines 5 µm dünnen Her2 positiven Brustkrebsgewebeschnitts, detektiert mit Hilfe eines MeCAT(^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörper. (A) Zeigt die konventionelle IHC-Färbung, (B) zeigt die 2D Intensitätsprofil der Ho-Rohdaten, (C) zeigt die Indium normierten Ho-Intensitäten und (D) die Iod-normierten Ho Signale. Die charakteristischen Tumorbereiche im Gewebe wurden für eine leichte Wiedererkennung zwischen IHC und 2D Intensitätsprofil mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Die untere Abbildung zeigt eine Vergrößerung der markierten Bereiche. Laserparameter: Laserspotgröße von 50 µm, Laserscangeschwindigkeit von 50 µm s⁻¹, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Im direkten Vergleich der 2D Intensitätsprofile mit der konventionellen IHC-Färbung zeigt sich eine gute Übereinstimmung der positiven Tumorbereiche im Gewebeschnitt. Das initiale 2D Intensitätsprofil für Holmium zeigt ein SBR von 18 mit einer guten Darstellung der Tumorbereiche. Für das Iod-normierte Ho-Intensitätsprofil wurden hohe Hintergrundsignale und somit nur ein SBR Wert von 11 ($^{165}\text{Ho}/^{127}\text{I}$) ermittelt. Hingegen zeigt das Indium normierte Ho-Intensitätsprofil eine klare Abgrenzung und eine signifikant bessere Darstellung der tumorösen Bereiche im Gewebeschnitt (siehe Abbildung 31-C). Mit Hilfe von Indium konnte eine deutliche Akzentuierung der Tumorbereiche (siehe Abbildung 31, schwarz markierte Kreise), unter Verwendung kleiner Laserspotgrößen, mit einem SBR von 39 ($^{165}\text{Ho}/^{115}\text{In}$) erzielt werden (siehe Tabelle 8). Das Iod-normierte Ho-Intensitätsprofil zeigte schlechtere SBR Werte aufgrund von höheren Hintergrundsignalen und einer Proteinkonzentrationsabhängigkeit des Iodsignals. Eine Zunahme der Signalintensitäten für Ho und Iod an der gleichen Position im Gewebeschnitt führen bei der Normierung zu Signalabschwächung und damit zu einer Verschlechterung der Bildqualität der Tumoreale im 2D Intensitätsprofil.

Tabelle 8 Zusammenfassung der berechneten Kenngrößen für die Bewertung der beiden internen Standards (100-240s).

	^{165}Ho	$^{166}\text{Ho}/^{127}\text{I}$	$^{166}\text{Ho}/^{115}\text{In}$
Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SBR)	18	11	39

Laserspotgröße [μm], Laserscangeschwindigkeit [$\mu\text{m s}^{-1}$]: 50

Für eine bessere Bildanalyse wurden charakteristische Bereiche der IHC-Färbung und der 2D Intensitätsprofile vergrößert dargestellt (siehe Abbildung 32). Links in der Abbildung 32 (A) ist die IHC-Färbung der Tumorbereiche als Referenz angegeben. Die Referenz zeigt die Her2 positiven Bereiche durch eine starke Braunfärbung an. Während die farbcodierten 2D Intensitätsprofile eine Abstufung der Signalintensitäten für die Her2-positiven Bereiche darstellen.

Die Vergrößerungen der Reihen I/II/III zeigen für die IHC gefärbten Gewebereiche, das Ho und das Iod-normierte Ho-2D Intensitätsprofil eine homogene Darstellung der Tumorbereiche. Lediglich die Indiumnormierten Ho-Intensitätsbereiche weisen Akzentuierungen, also Signalunterschiede der detektieren Tumorbereich auf, resultierend aus

der Her2 Konzentration in dem Gewebeschnitt. In der Reihe III zeigt sich das Ausmaß der schlechteren Kontrastverstärkung der Iod-normierten Ho-2D Intensitätsprofile.

Während das IHC-Bild, das Ho- und Ho/In- 2D Intensitätsprofil einen kleinen Tumorbereich klar und deutlich darstellen, deutet die Iod-Normierung diesen Bereich nur als leichte Schattierung an. Diese Detektion verdeutlicht die Einschränkung der Iodierung auf die Laserspotgröße von 200 μm aufgrund der Iod-Signalabhängigkeit zur Proteindichte, die im Karzinombereich zunimmt.

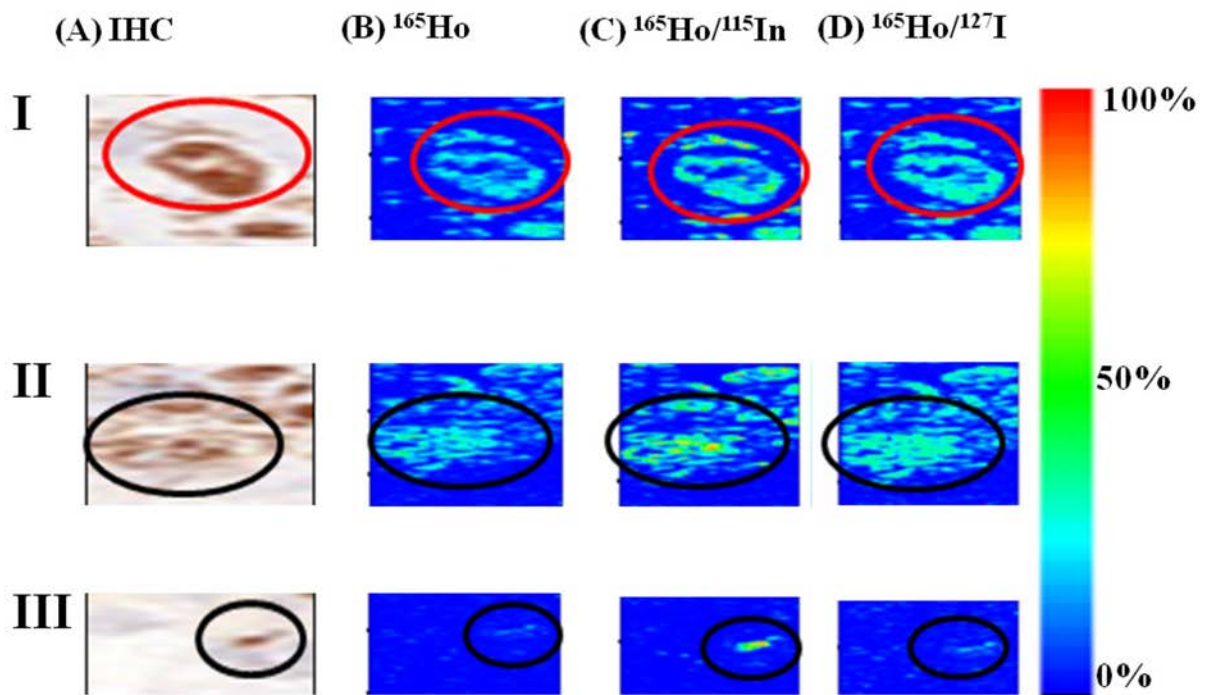


Abbildung 32 Vergrößerte Details der signifikanten Tumorbereiche im Brustkrebsgewebeschnitt (A) zeigt die konventionelle IHC-Färbung, (B) zeigt die 2D Intensitätsprofil der Ho-Rohdaten, (C) zeigt die Indium-normierten Ho-Signale und die (D) Iod-normierten Ho-Signale. Die charakteristischen Tumorbereiche im Gewebe wurden für eine leichte Wiedererkennung, zwischen IHC und 2D Intensitätsprofil, mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Die mit einem schwarzen Kreis gekennzeichneten Bereiche zeigen signifikante Unterschiede in der Kontrastierung der detektierten Bereiche. Laserparameter: Laserspotgröße von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Nach erfolgreicher Anwendung des internen Standards in der LA-ICP-MS Detektion von Tumorbereichen in Gewebeschnitten wurde die Markierungsstrategie, sowie die Indium Standardisierung in einem 8-fach Multiplex-Ansatz erprobt. Auf eine Iodierung der Gewebeschnitte wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit verzichtet.

3.6 8-fach Multiplex-Ansatz zur Untersuchung von Prostatakarzinomen

3.6.1 Einleitung und Prinzip des 8-fach Multiplex-Ansatzes für Tissue Micro Arrays

Ziel war es einen Multiplex *Tissue Micro Array* (TMA)-Gewebeschnitt [41] mit acht unterschiedlichen MeCAT-modifizierten, spezifischen Antikörpern für die qualitative Bildgebung, mittels LA-ICP-MS zu entwickeln. Für die Untersuchung wurden Formalin-fixierte in Paraffin-eingebettete (FFPE) Test-TMAs, die aus 100 Prostatakarzinomproben, sowie 20 Kontrollbiopsieproben bestanden, gewählt (siehe Kapitel 2.6.4). Der TMA-Gewebeschnitt war 16 mm x 14 mm groß, und jede darin enthaltene Biopsieprobe hatte einen Durchmesser von 2 mm. Die 20 Kontrollproben auf dem TMA dienten als negativ-Kontrolle und waren nicht positiv für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper. Hingegen waren die 100 Prostatakarzinom-Proben positiv für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper. Der 5 µm dünne Gewebeschnitt wurde auf Superfrost Plus-Objektträgern immobilisiert, mit Antikörpern inkubiert (siehe Material und Methoden 5.5.1) und untersucht. Diese Objektträger sind so beschichtet, dass der Gewebeschnitt eine hohe Affinität zum Objektträger aufweist. Die Probenvorbehandlung, sowie die IHC-Färbung erfolgte im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) (siehe Material und Methoden 5.5.1).

Es wurden die folgenden vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper eingesetzt: anti-Erg1/2/3-Antikörper, anti-Androgenrezeptor-Antikörper, anti-prostataspezifische Membran-Antigen (PSMA)-Antikörper und anti-AMACR (Alpha-Methylacyl-Coenzym-A-Racemase, Synonym: P405S)-Antikörper. Diese Antikörper werden im medizinisch diagnostischen Bereich für die Identifizierung und Klassifizierung von Adenokarzinomen mit Hilfe der IHC-Färbung eingesetzt (siehe Material und Methoden 5.6.6) und sind entsprechend zugelassen und validiert.

Für die IHC-Färbung werden normalerweise für jeden der Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper unterschiedliche Puffer für die Demaskierung des Gewebeschnittes eingesetzt. Um für die beiden unterschiedlichen Detektionsmethoden identische Bedingungen zu schaffen wurden sogenannte Kompromissbedingungen mit einem Tris-EDTA-Citratpuffer (pH 7,8) für die Demaskierung eingesetzt. Dies war notwendig, da für die LA-ICP-MS Detektion alle Antikörper simultan mit einem Gewebeschnitt inkubiert werden sollten (siehe Material und Methoden 5.5.1).

Zusätzlich wurde ein anti-Mucine-1 (MUC1)-Antikörper verwendet, da das Protein MUC1 als potentieller Tumormarker für Adenokarzinome diskutiert wird. Als absolute negativ-Kontrolle, für alle 120 Einzelproben auf dem TMA-Gewebeschnitt, wurde der anti-Her2-Antikörper eingesetzt. Das Protein Her2 spielt bisher ausschließlich eine signifikante Rolle in der Behandlung und Diagnose des Mammakarzinoms. Eine erhöhte Detektion dieses Proteins via LA-ICP-MS ist nicht zu erwarten.

Zusätzlich wurden zwei weitere Antikörper; anti-Aktin-Antikörper und anti-GAPDH-Antikörper eingesetzt, um sogenannte Haushaltsproteine im Gewebe zu detektieren. Haushaltsproteine sind charakteristische Proteine, die unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium, oder anderen Einflüssen, konstant exprimiert werden. Desweiteren sollte geprüft werden, ob die LA-ICP-MS Detektion der ausgewählten Haushaltsproteine geeignet ist, um die Schwankung der Gewebeschichtdicke und Inhomogenität des Gewebes sowie das teilweise Fehlen von Gewebebereichen, auszugleichen, so dass diese als Korrekturfaktor eingesetzt werden könnten. Für den anti-Muc-1-Antikörper, anti-Her-2-Antikörper, anti-Aktin-Antikörper und anti-GAPDH-Antikörper wurden keine IHC-Färbungen angefertigt, da diese vier Antikörper nicht in der klinischen Diagnostik für die Klassifizierung oder Identifizierung von Adenokarzinomen eingesetzt werden. Ein entsprechender Sekundärantikörper stand uns nicht zur Verfügung. Alle acht Antikörper wurden mit einem 600-fachen molaren Überschuss an Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP) jeweils teilreduziert. Nach Entfernung des überschüssigen Reduktionmittels, erfolgte die Markierung mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT [55] (Material und Methoden/Kapitel 5.2.2). Die acht Antikörper wurden mit folgenden MeCAT(Lanthanid)-Reagenzien modifiziert: anti-Erg1/2/3 MeCAT(¹⁵³Eu), anti-Androgenrezeptor-MeCAT(¹⁶⁹Tm), anti-PSMA MeCAT(¹⁷⁵Lu) und anti-AMACR MeCAT(¹⁴¹Pr); anti-MUC1 MeCAT(¹⁵⁹Tb); anti-Her-2 MeCAT(¹⁷⁴Yb); anti-Aktin MeCAT(¹⁴⁶Nd) und anti-GAPDH MeCAT(¹⁶⁶Er).

Zur Validierung dieser neuen direkten Multiplex-Detektionsmethode wurden TMAs jeweils mit einem der klinisch-relevanten Antikörper inkubiert und mit der kommerziellen IHC-Färbung detektiert (siehe Abbildung 33). In einem weiteren Versuch wurde ein TMA-Gewebeschnitt mit allen acht Antikörpern simultan unter Kompromissbedingungen inkubiert (siehe Material und Methoden 5.6.6.1) und mit der LA-ICP-MS detektiert (Multiplex).

Diese Daten können mit den Einzelaassays verglichen werden. Auf diese Weise würden unspezifische Wechselwirkungen/Kreuzreaktionen zwischen den Antikörpern im Multiplex-Ansatz erkennbar.

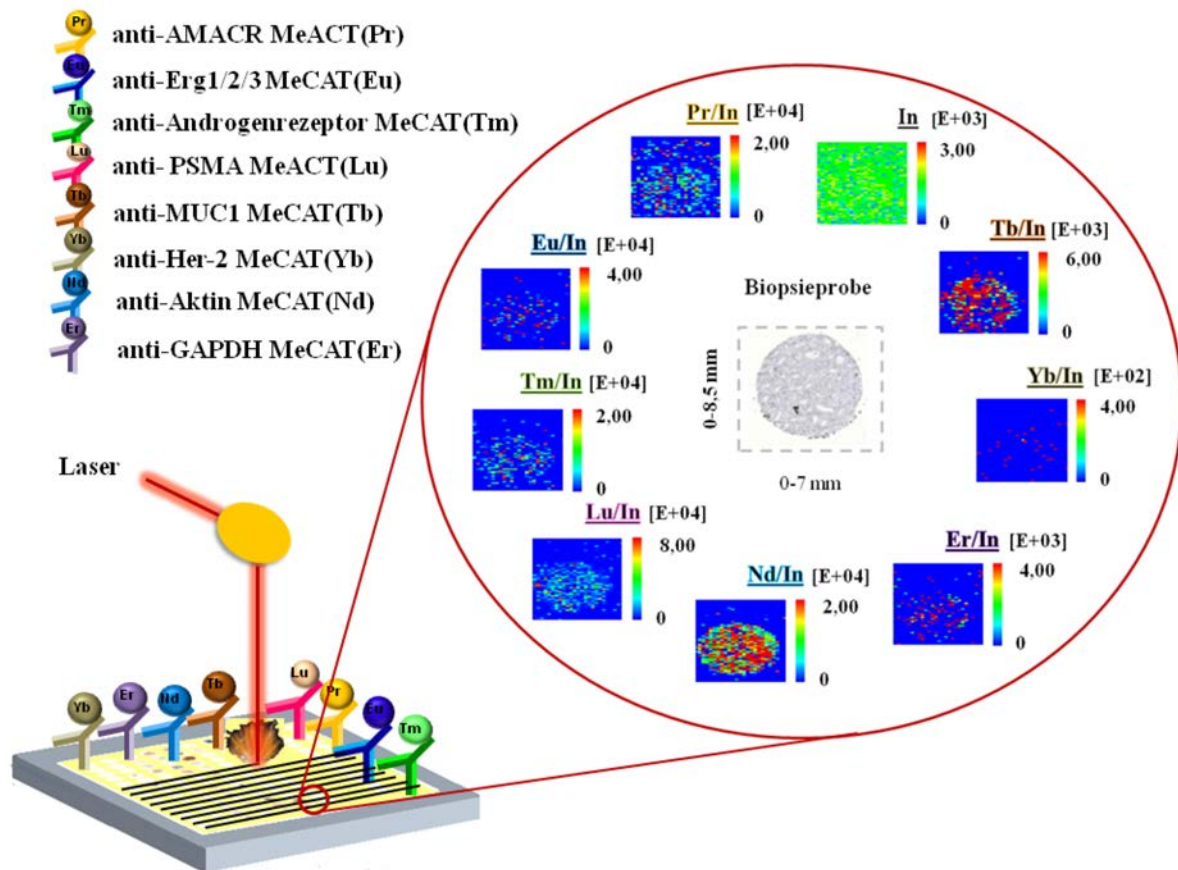


Abbildung 33 Schematische Darstellung des 8-fach Multiplex-Assay an einem *Tissue Micro Array* (TMA)-Gewebeschnitt mit folgenden Antikörpern (AK); anti-Erg1/2/3-AK MeCAT(^{153}Eu), anti-Androgenrezeptor-AK MeCAT(^{169}Tm), anti-prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA)-AK MeACT(^{175}Lu), anti-AMACR-AK MeACT(^{141}Pr); einen Antikörper gegen einen potentiellen Tumormarker; anti-MUC1-AK MeCAT(^{159}Tb); einen Antikörper als absolute negativ-Kontrolle; anti-Her-2-AK MeCAT(^{174}Yb), sowie zwei Antikörper gegen Haushaltsproteine; anti-Aktin-AK MeCAT(^{146}Nd) und anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er). Als Referenz wurden für die vier klinisch-relevanten Antikörper IHC-Färbungen angefertigt.

Als interner Standard wurde eine Gewebeprobe, mit Indium-gespikter, gelber Tinte, mit einem kommerziellen Tintenstrahldrucker, vollständig mit einer 20%igen Druckdichte bedruckt. Die Analyse erfolgte mit einer Laserspotgröße von $50\text{ }\mu\text{m}$, einer Laserscangeschwindigkeit von $50\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, einer Laserspotgrößen-Überlappung für eine vollständigen Abtrag von $35\text{ }\mu\text{m}$, was einer Auflösung von $35\text{ }\mu\text{m}$ entspricht, einer

Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%). Das Gewebe wurde bei einer Analysenzeit von 16 h pro TMA-Gewebeschnitt vollständig abgetragen. Unter Verwendung von Excel wurde das jeweilige Intensitätsprofil der acht Lanthanide auf das Indiumsignal des internen Standards normiert, um die Schwankungen während der LA-Messung zu korrigieren.

Die Untersuchungen fanden an insgesamt neun TMA-Gewebeschnitten von Prostatakarzinomen statt. Aufgrund des hohen Aufwandes zur Herstellung der Gewebeproben und der nicht unerheblichen Kosten konnte nur eine begrenzte Anzahl an TMA-Gewebeschnitten durch den Kooperationspartner zur Verfügung gestellt werden.

3.6.2 IHC-Färbung an TMA-Gewebeschnitten mit klinisch-relevanten Antikörpern

Für jeden der vier klinisch-relevanten Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper existieren unterschiedliche, optimierte IHC-Protokolle mit unterschiedlichen Demaskierungen der Antigene im Gewebe existieren (siehe Kapitel 2.6.3). Die Demaskierungsprotokolle sind abhängig von dem Antikörper. Für einen direkten Vergleich der beiden Detektionsmethoden, IHC (siehe Material und Methoden 5.6.6) vs. LA-ICP-MS, wurden Kompromissbedingungen für die Pufferlösung (pH 7,8) der Demaskierung gewählt. Diese Bedingungen wurden für alle TMA-Gewebeschnitte eingesetzt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der vier klinisch-relevanten Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

Die 20 Kontrollbiopsieproben sind durch blaue (rechter Abschnitt B) und die 100 positiven Biopsieproben sind durch rote Rechtecke markiert (linker Abschnitt A, siehe Abbildung 34). Für die direkte als auch für die indirekte Detektionsmethode, sollten die klinisch-relevanten Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper ausschließlich an den 100 positiven Biopsieproben detektiert werden (rot markiert, linker Bereich A, siehe Abbildung 34). Hingegen sollten diese Antikörper keine Bindung bzw. nur eine schwache Bindung mit den 20 Kontrollproben eingehen (blau markiert, rechter Bereich B, siehe Abbildung 34). Die IHC-Färbungen der Abbildung 34, für die vier klinisch-relevanten Prostatakarzinom-spezifischen Antikörpern zeigen eine scheinbare inhomogene (siehe Abbildung 34 (1)-(4)) oder kontinuierliche (siehe Abbildung 34 (2)-(3)) Braunfärbung.

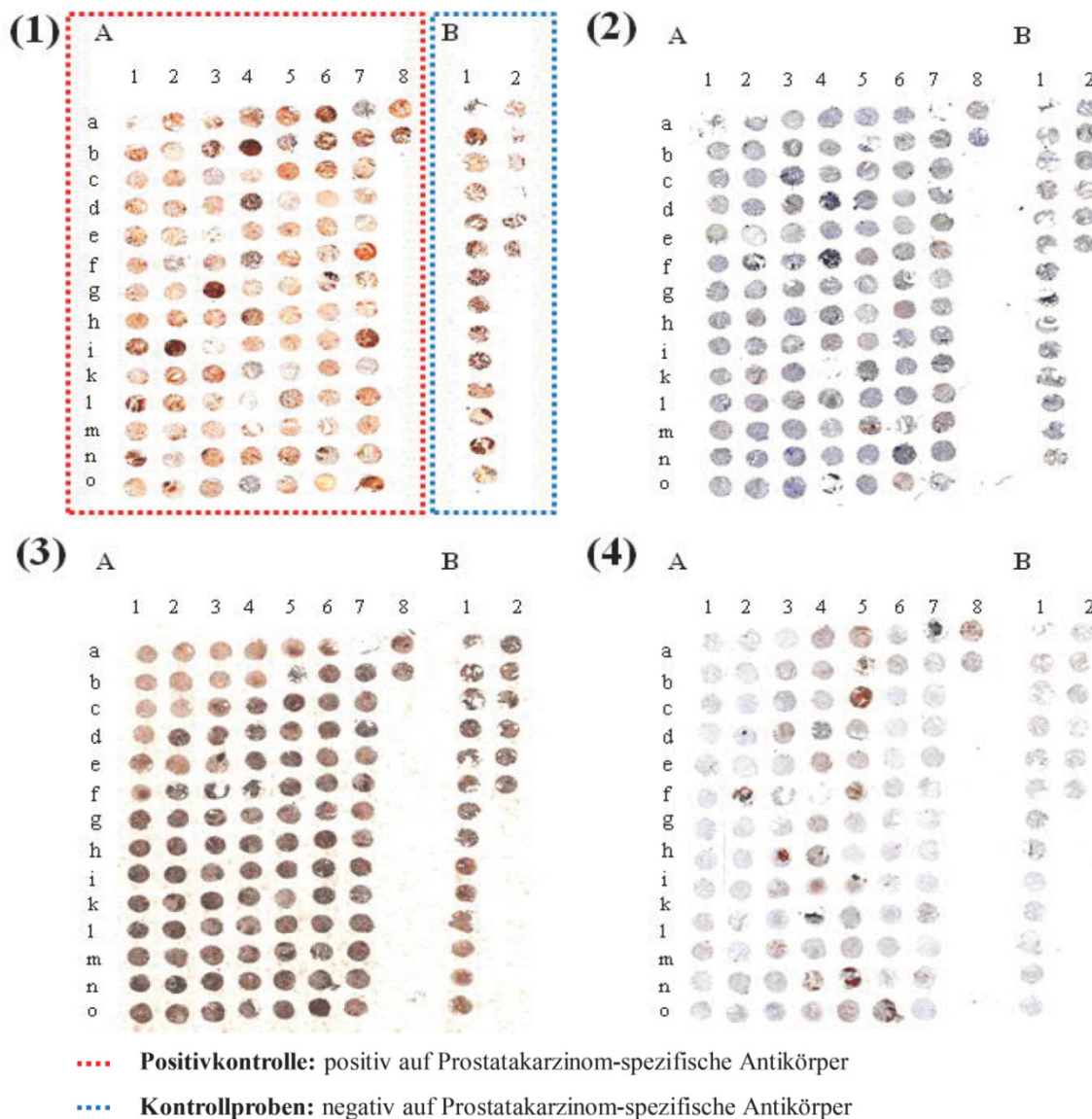


Abbildung 34 Zeigt immunhistochemische Färbungen (indirekte Methode) von 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnitten vom Prostatakarzinom-Patienten unter mittleren Reaktionsbedingungen. Es wurden Test-TMA-Gewebeschnitte eingesetzt, die aus Biopsiekontrollproben und positiven Biopsieproben bestehen; grün umrandet: 20 Biopsiekontrollproben die negativ für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper sind; rot umrandet: 100 positive Biopsieproben die positiv für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper sind. Biopsieproben die eine signifikantere Braunfärbung zeigen sind orange markiert. Der TMA-Gewebeschnitt ist 16 x 14 mm groß und jede Biopsieprobe hat einen Durchmesser von 2 mm. Folgende Prostatakarzinom-spezifische Antikörper (1) anti-Erg1/2/3-AK; (2) anti-Androgenrezeptor-AK; (3) anti-PSMA-AK und (4) anti-AMACR-AK wurden eingesetzt.

Für eine detaillierte Beurteilung wurden die IHC gefärbten Tumorgewebeproben unter dem Mikroskop untersucht und über eine visuelle Abschätzung in 4 Grade (0 bis 3) eingeteilt, um den Differenzierungsgrad des Krebsgewebes anzugeben, bzw. das Ausmaß, in dem es von

dem normalen Gewebe abweicht (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.2 Tabelle 32- 34). Je höher der Differenzierungsgrad desto schlechter ist die Behandlungsaussicht des Patienten. Der Differenzierungsgrad von 0 wird bei Normalgewebe vergeben. Die Zuordnung der Gradierung der IHC gefärbten einzelnen TMA-Gewebeschnitte, unter mittleren Reaktionsbedingungen, wurde vereinfacht farbkodiert (3-Farben-Skala) in Abbildung 35 dargestellt. Dabei wurden die Farben wie folgt zugeordnet; blau: Normalgewebe Grad 0, grün: gut differenziertes, jedoch bösartiges Gewebe, bzw. hohe Übereinstimmung mit Normalgewebe; gelb: mäßig differenziertes bösartiges Gewebe und rot: schlecht differenziertes bösartiges Gewebe. Unter optimierten Reaktionsbedingungen sollte jeder TMA-Gewebeschnitt aus 20 blau gefärbten Biopsiekontrollproben, die negativ für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper sind, bestehen, sowie 100 Biopsieproben, die vorwiegend grün, gelb, rot, bzw. auch teilweise blau gefärbt sein sollten. Die farbkodierte Gradierung zeigt für jeden der vier TMA-Gewebeschnitte eine positive Detektion der 20 Biopsiekontrollproben ($\neq 0$ bzw. blau), obwohl diese negativ für die Prostatakarzinom-spezifische Antikörper sein sollten. Es kommt hier zu einer falsch-positiven Detektion. Ein Grund für die nicht aussagekräftige IHC-Färbung kann die Wahl der mittleren Reaktionsbedingungen für die Demaskierung der Antigene im Gewebe und die anschließende Färbung mit Sekundärantikörpern sein. Da diese indirekte immunologische Nachweismethode nur unter definierten Bedingungen optimal funktioniert. Zusätzlich kann die Wahl des Antikörperherstellers und somit die Qualität der Antikörper eine große Rolle spielen. Von der klinischen Diagnostik am UKE wurden vier Antikörper empfohlen, die aber aufgrund der hohen BSA-und Gelatine- Verunreinigungen in den Antikörperlösungen, nicht verwendet werden konnten. Da Verunreinigungen, insbesondere durch Proteine (BSA), die MeCAT-Markierung stören.

In der Literatur sind für konventionelle IHC-Färbungen von Prostatakarzinom-Proben unter optimierten Bedingungen, folgende Ergebnisse für die vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper beschrieben. Für Prostatakarzinom-Patienten sind 40-70% der Biopsieproben Erg positiv [165], 50% Androgenrezeptor positiv [166], 90% PSMA [167] und 88% AMACR positiv [168]. Die detektierten Ergebnisse stimmen nicht mit obigen Literaturwerten überein.

(1) Erg



(2) Androgenrezeptor



(3) PSMA



(4) AMACR



Abbildung 35 Zeigt für die einzelnen Biopsieprobenroben des 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnittes eine vereinfachte Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der Gradierung in der IHC-Färbung unter mittleren Reaktionsbedingungen. Dabei steht der Grad 0 für blau, Grad 1 für grün, Grad 2 für gelb und Grad 3 für rot. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben die positiv sind (linker Abschnitt A1-8). Folgende Prostatakarzinom-spezifische Antikörper (1) anti-Erg-AK; (2) anti-Androgenrezeptor-AK; (3) anti-PSMA-AK und (4) anti-AMACR-AK wurden eingesetzt.

3.6.3 Vergleich des 8-fach Multiplex-Assay sowie die Single-Assays an TMA-Gewebeschnitten via LA-ICP-MS

Der 8-fach Multiplex-Assay wurde an einem *Tissue Micro Array* (TMA)-Gewebeschnitt vom Prostatakarzinom mit acht spezifisch modifizierten Primärantikörpern mittels IHC und LA-ICP-MS untersucht. Für die LA-ICP-MS Detektion wurden 8 modifizierte Antikörper gemeinsam und die vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper jeweils einzeln mit einem TMA-Gewebeschnitt inkubiert, um Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern im Multiplex-Ansatz ausschließen zu können. Als interner Standard wurde für die LA-ICP-MS Detektion Indium verwendet (siehe Kapitel 5.4.2). Die Detektion erfolgte, wie in der Einleitung zu dem Kapitel 3.6 beschrieben. Aus den LA-ICP-MS Rohdaten wurden Indium-normierte Intensitätsprofile erzeugt (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.3 Abbildung 66-Abbildung 69), um die entsprechenden Peakflächen der einzelnen Biopsieproben für die vier klinischen Biomarker zu generieren. In Kapitel 5.1.2 wird die Darstellung der Intensitätsprofile, sowie die Berechnung der Peakflächen detailliert beschrieben.

Die Auflösung der LA-ICP-MS reichte noch nicht aus, um Veränderungen der Gewebestrukturen oder Zellkerne zu detektieren. Trotz der begrenzten Auflösung können reale Zahlenwerte in Form von Peakflächen für die einzelnen Biopsieproben ermittelt werden. Für eine bessere Übersicht und einen vereinfachten direkten Vergleich zur IHC-Färbung wurden die Peakflächen ebenfalls in einer 3-Farben-Skala (blau-gelb-rot) kodiert und dargestellt. Eine Zuordnung der Differenzierungsgrade von 0 bis 3 zu den entsprechenden Peakflächen, sowie der Farbkodierung: blau = 0, grün = 1, gelb = 2 und rot = 3 wie im Kapitel 3.6.2 war nicht möglich, da es keine aussagekräftigen IHC-Färbungen gibt. Um eine ähnliche Abstufung zu den Differenzierungsgraden zu erzielen, wurden die Peakflächen der LA-ICP-MS analog zur IHC farbkodiert. Der Peakflächenbereich des Abschnittes B1-2 (Kontrollproben bzw. Normalgewebe) des jeweiligen TMA-Gewebeschnittes, ist für die Bindung von Prostatakarzinom-spezifischen Antikörpern negativ. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der LA-ICP-MS wurde eine geringe Hintergrundintensität von 10^5 counts für die Prostatakarzinom-spezifischen Proteinmarker in Normalgewebe (B1-2) detektiert. Die Höhe des Signalhintergrundes der Kontrollproben (10^5 counts) (Abschnitt B1-2) des jeweiligen TMA-Gewebeschnittes wurde als Schwellwert für eine positive Detektion festgelegt. Jede Peakfläche des Bereichs A1-8, die einen höheren Zahlenwert aufweist als der Abschnitt B1-2, ist somit positiv für die Bindung von Prostatakarzinom-spezifischen

Proteinmarker (siehe Abbildung 34). Der Peakflächenbereich für die Abschnitte B1-2 liegt in der Größenordnung von ca. 10^5 counts und für den Abschnitt A1-8 in der Größenordnung von 10^5 - 10^8 counts, so dass es bei der Farbkodierung zu einer breiteren Farbmischung als bei der IHC-Färbung kommt (siehe Abbildung 35-39). Der Abschnitt B1-2 ist blau bis dunkelgrün. Hingegen zeigt der Abschnitt A1-8 einen Farbenbereich von rot, orange, gelb und grün (siehe Abbildung 36-39).

Die einzelnen Peakflächen für jede Biopsieprobe des Multiplex-TMA-Gewebeschnittes sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.3 Tabelle 35-37). Die Peakflächenbereiche für den anti-Erg-Antikörper MeCAT(^{153}Eu) und den anti-AMACR-Antikörper MeCAT(^{141}Pr) liegen innerhalb einer Größenordnung von 10^5 counts für die negativen Kontrollproben (B1-2, siehe Abbildung 36, Abbildung 39), während der Peakflächenbereich für den anti-Androgenrezeptor-Antikörper MeCAT(^{169}Tm) und den anti-PSMA-Antikörper MeACT(^{175}Lu) eine höhere Intensität von 10^5 - 10^6 counts für die negativen Kontrollproben (B1-2) zeigen (siehe Abbildung 37, Abbildung 38). Für den Prostatakarzinom-Bereich (A1-8) konnten mit dem anti-Erg-Antikörper MeCAT(^{153}Eu) die höchsten Intensitäten von 10^6 - 10^8 counts für die Peakflächen detektiert werden (siehe Abbildung 36). Hingegen zeigten die drei weiteren Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper Intensitäten von 10^6 - 10^7 counts für die Peakflächenbereiche (siehe Abbildung 37-39).

Es konnten signifikante Unterschiede zwischen den Peakflächen der negativen Kontrollproben B1-2 und der positiven Prostatakarzinom-Proben A1-8, um einen Faktor von 20 bis 200 ermittelt werden. Für die Indium-normierten Signale folgende Signal-Untergrund-Verhältnisse (SBR) bestimmt werden konnten; für anti-Erg1/2/3-Antikörper ($^{153}\text{Eu}/^{115}\text{In}$) von 200, für anti-Androgenrezeptor-Antikörper ($^{169}\text{Tm}/^{115}\text{In}$) von 300 und für anti-AMACR-Antikörper ($^{141}\text{Pr}/^{115}\text{In}$) von 250. Für den anti-PSMA-Antikörper($^{175}\text{Lu}/^{115}\text{In}$) konnten die besten SBRs von 2.000 detektiert werden (siehe Tabelle 9).

Von den 100 Prostatakarzinom-Proben (A1-8) wurden 67% mit positiven Erg Status, 52% mit positiven Androgenrezeptor Status, 90% mit positiven PSMA Status und 91% mit positiven AMACR Status und guten SBRs, mittels LA-ICP-MS ermittelt (siehe Abbildung 36-39). Diese Ergebnisse zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten (siehe Kapitel 3.6.2).

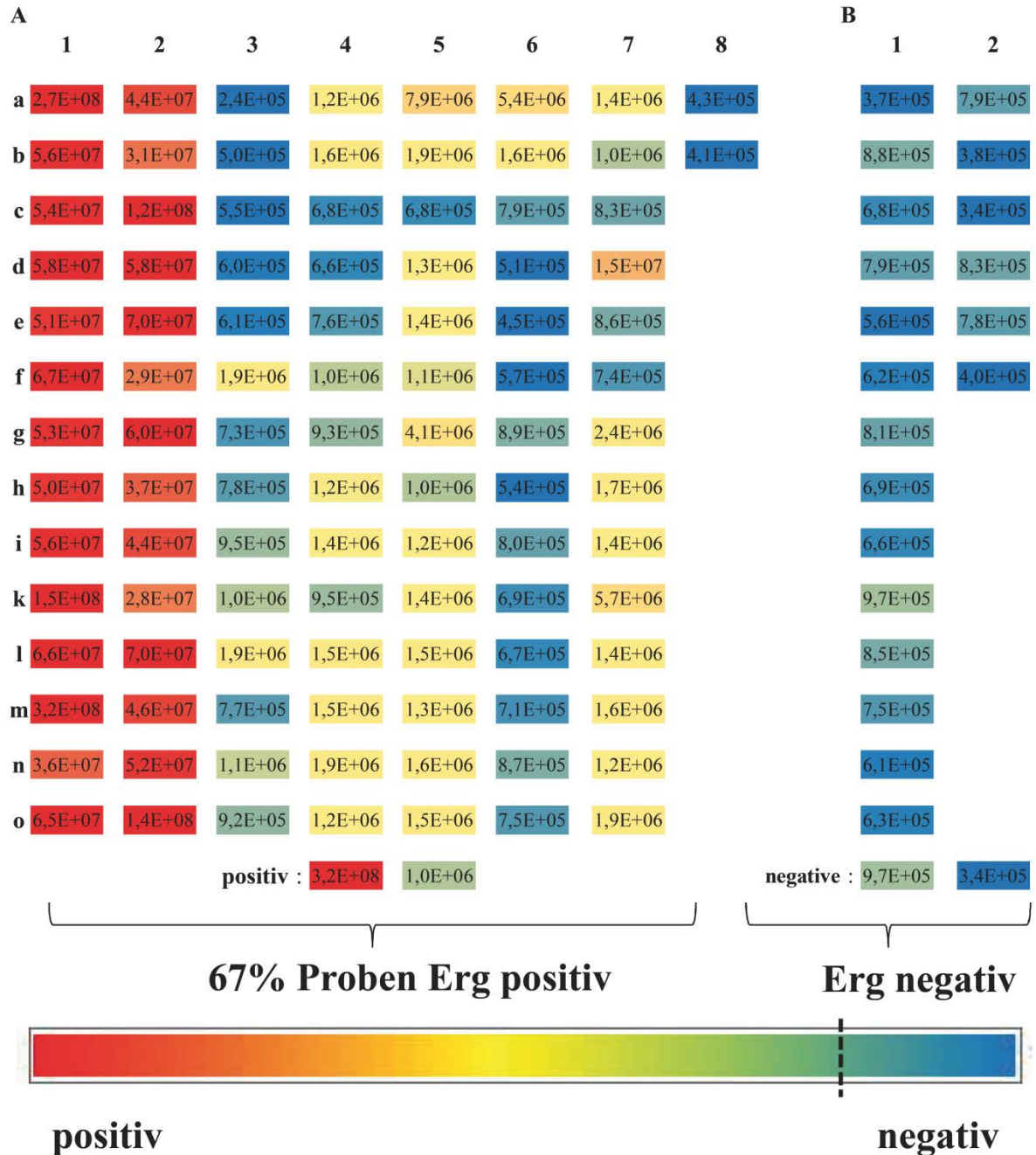
Erg ($^{153}\text{Eu}/^{115}\text{In}$)

Abbildung 36 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-Erg-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8).

Androgen ($^{169}\text{Tm}/^{115}\text{In}$)

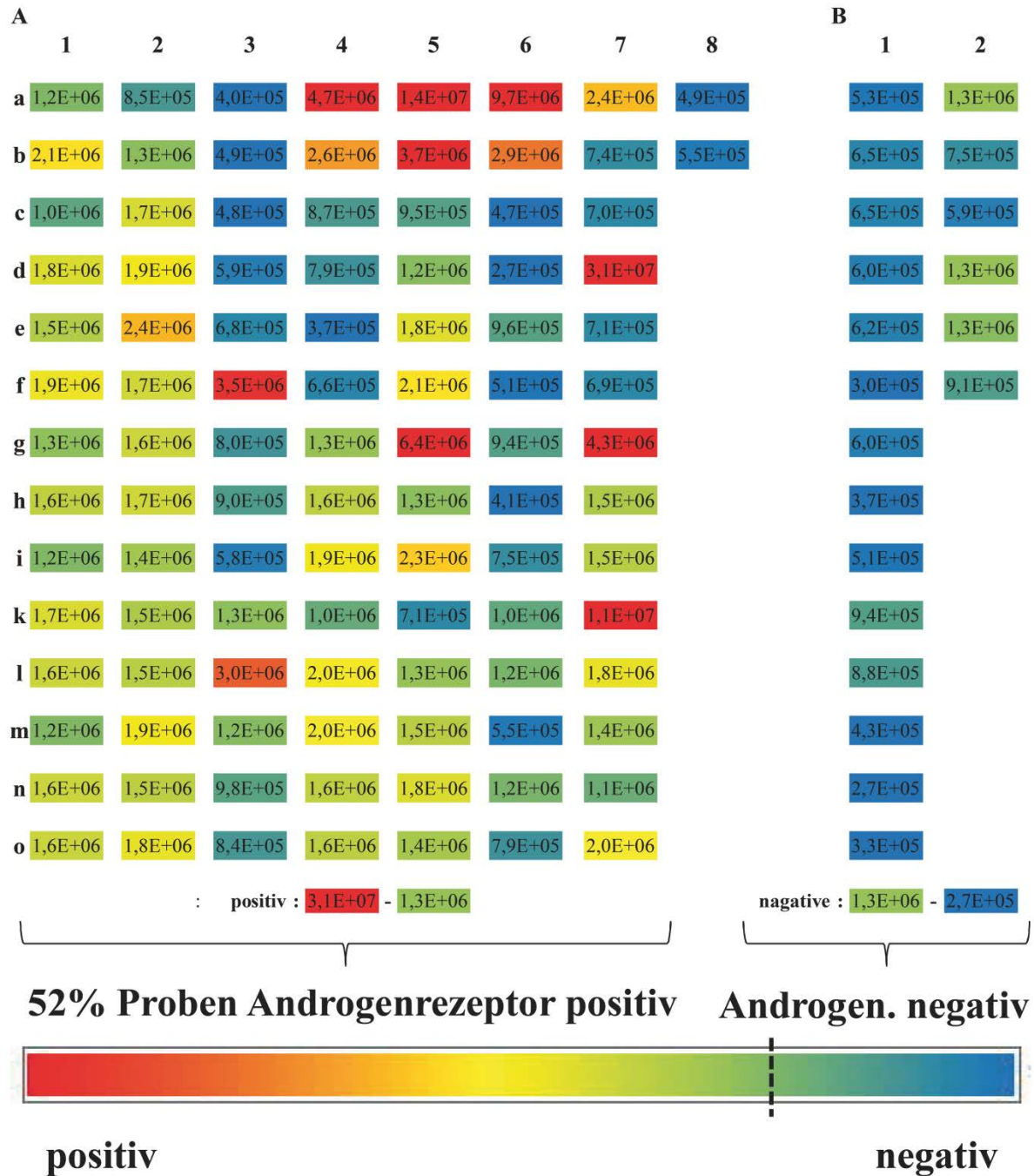


Abbildung 37 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-Androgenrezeptor-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8).

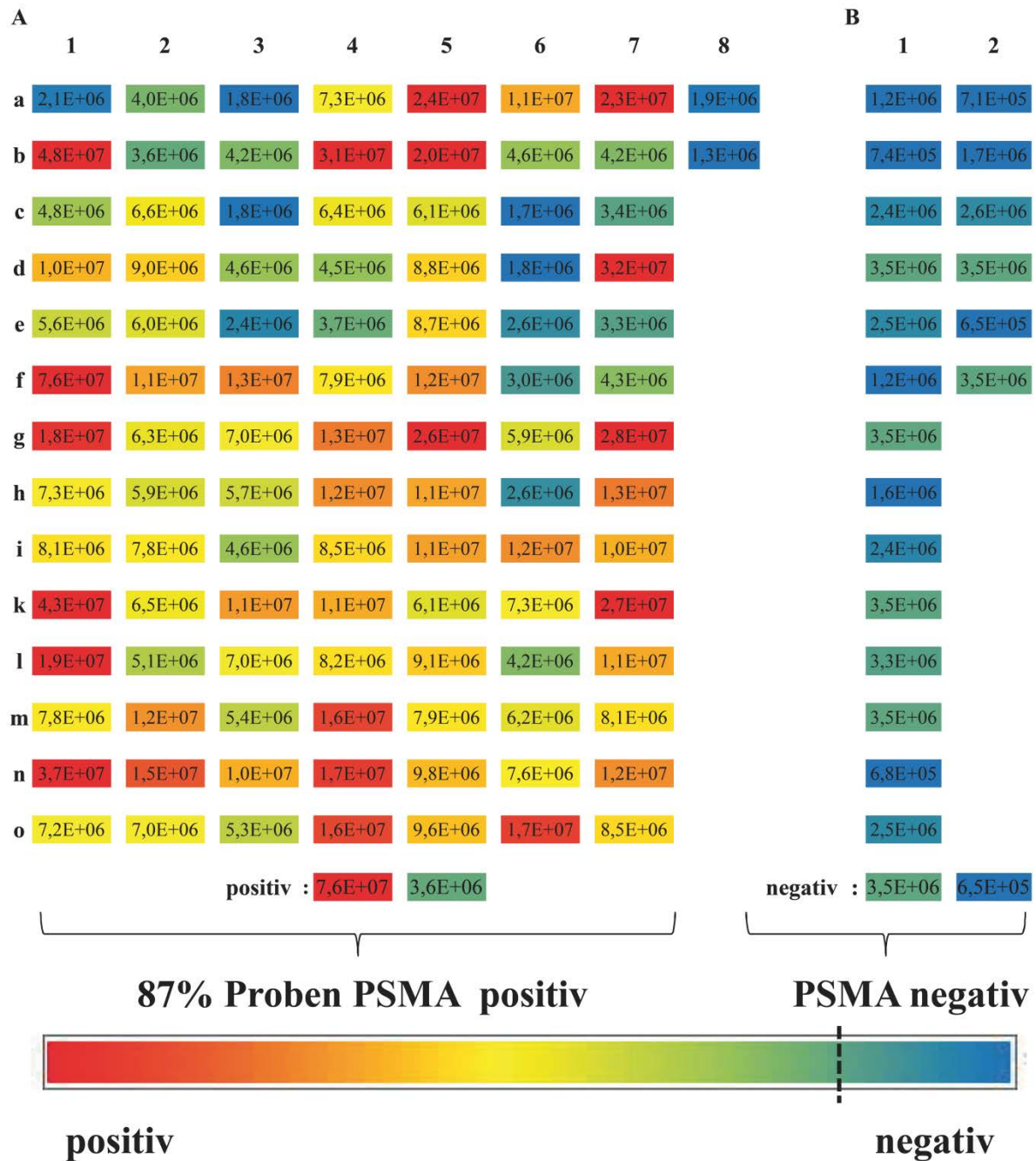
PSMA ($^{175}\text{Lu}/^{115}\text{In}$)

Abbildung 38 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-PSMA-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8).

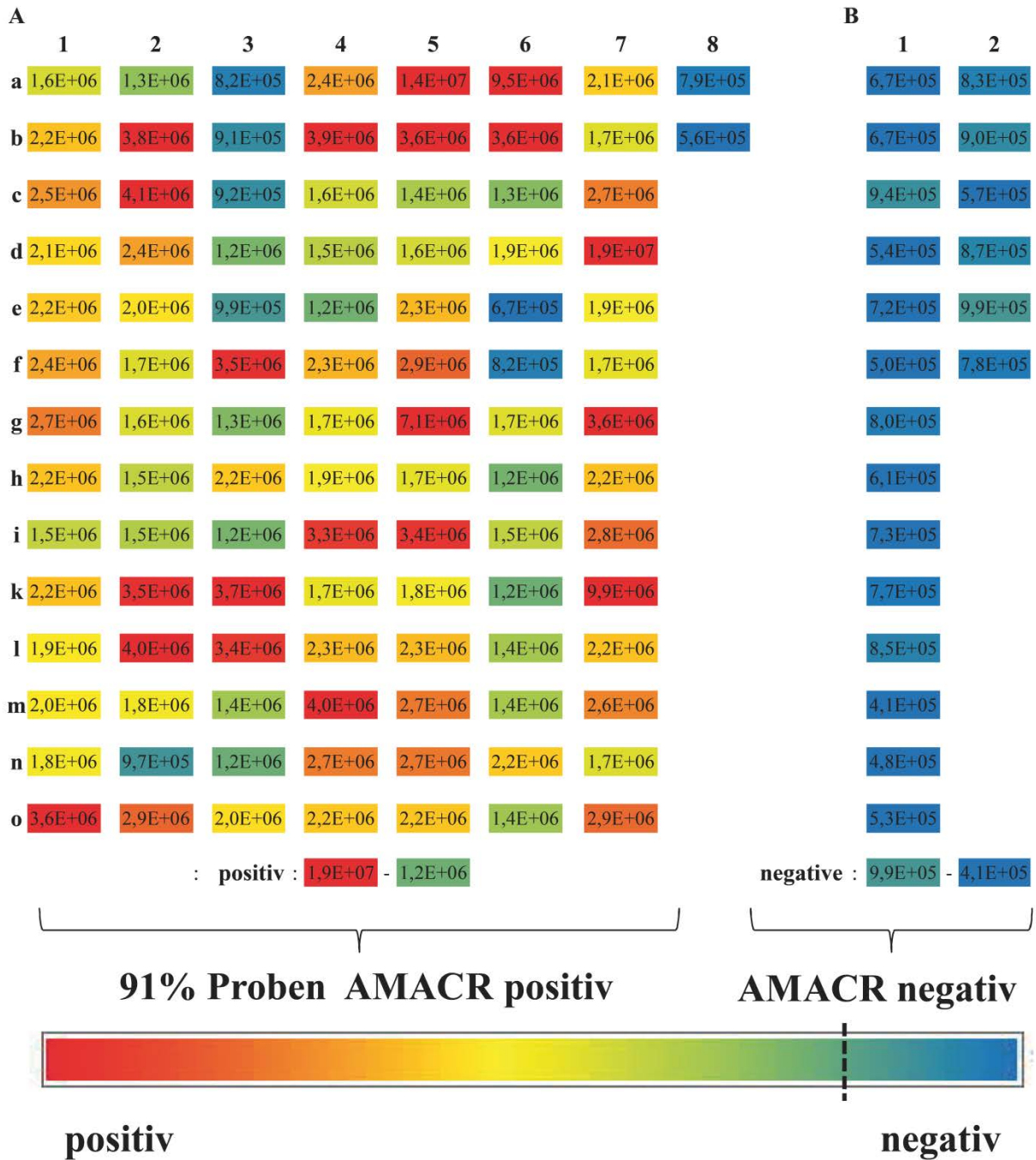
AMACR ($^{141}\text{Pr}/^{115}\text{In}$)

Abbildung 39 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-AMACR-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8).

Um Wechselwirkungen zwischen den acht modifizierten Antikörpern in dem Multiplex-Ansatz ausschließen zu können, wurden die vier modifizierten Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper einzeln mit dem TMA-Gewebeschnitt inkubiert und mittels LA-ICP-MS detektiert (siehe Abbildung 70). Im direkten Vergleich zwischen den normierten Intensitätsprofilen des Multiplex-Ansatzes und den normierten Intensitätsprofilen der Einzel-Ansätze für die Prostatakarzinom-spezifischen Antikörpern konnten Signalunterschiede um den Faktor 10 detektiert werden, aufgrund der biologischen Varianz, sowie Unterschiede der Gewebeschnitte. Zusätzlich haben einige der Biopsieproben teilweise Löcher, oder sind gar nicht vorhanden. Diese Probleme lassen sich in den lichtmikroskopischen IHC-Bildern (siehe Abbildung 34) beobachten und bestätigen die Unterschiede in den Signalintensitäten. Die Unterschiede in den Signalintensitäten limitieren die Reproduzierbarkeit der IHC-Färbung und der LA-ICP-MS. Es konnten keine unspezifischen Bindungen für die Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper im Multiplex-Ansatz, mittels LA-ICP-MS detektiert werden (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.3 Abbildung 70).

Neben den konventionellen Prostatakarzinom-spezifischen Antikörpern wurde ein potenzieller Biomarker MUC1 untersucht. Dafür wurde ein MeCAT(^{159}Tb)-modifizierter MUC1-Antikörper eingesetzt und das Indium-normierte Intensitätsprofil, sowie die entsprechenden Peakflächen erzeugt (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.3, Abbildung 71). Das normierte Intensitätsprofil zeigt keine erhöhten Signalintensitäten für die negativen Kontrollproben (B1-2). Es konnten eindeutig erhöhte Signalintensitäten für die positiven Prostatakarzinom-Proben (A1-8) detektiert werden. Die Indium normierten Signale für den anti-MUC1-Antikörper ($^{159}\text{Tb}/^{115}\text{In}$) zeigten einen SBR Wert im Bereich von 400-4000 (siehe Tabelle 9). Für eine detailliertere Auswertung wurden die Peakflächen, wie oben beschrieben, farbkodiert dargestellt (siehe Abbildung 40, siehe Anhang: Tabelle 35-37).

Von den 100 Prostatakarzinom-Proben (A1-8) wurden 7% mit positivem MUC1 Status und einem sehr guten SBR Wert detektiert. Aufgrund des geringen positiven Status, handelt es sich bei dem Protein MUC1 nicht um einen potentiellen Biomarker für die vereinfachte Erkennung von Prostatakarzinom.

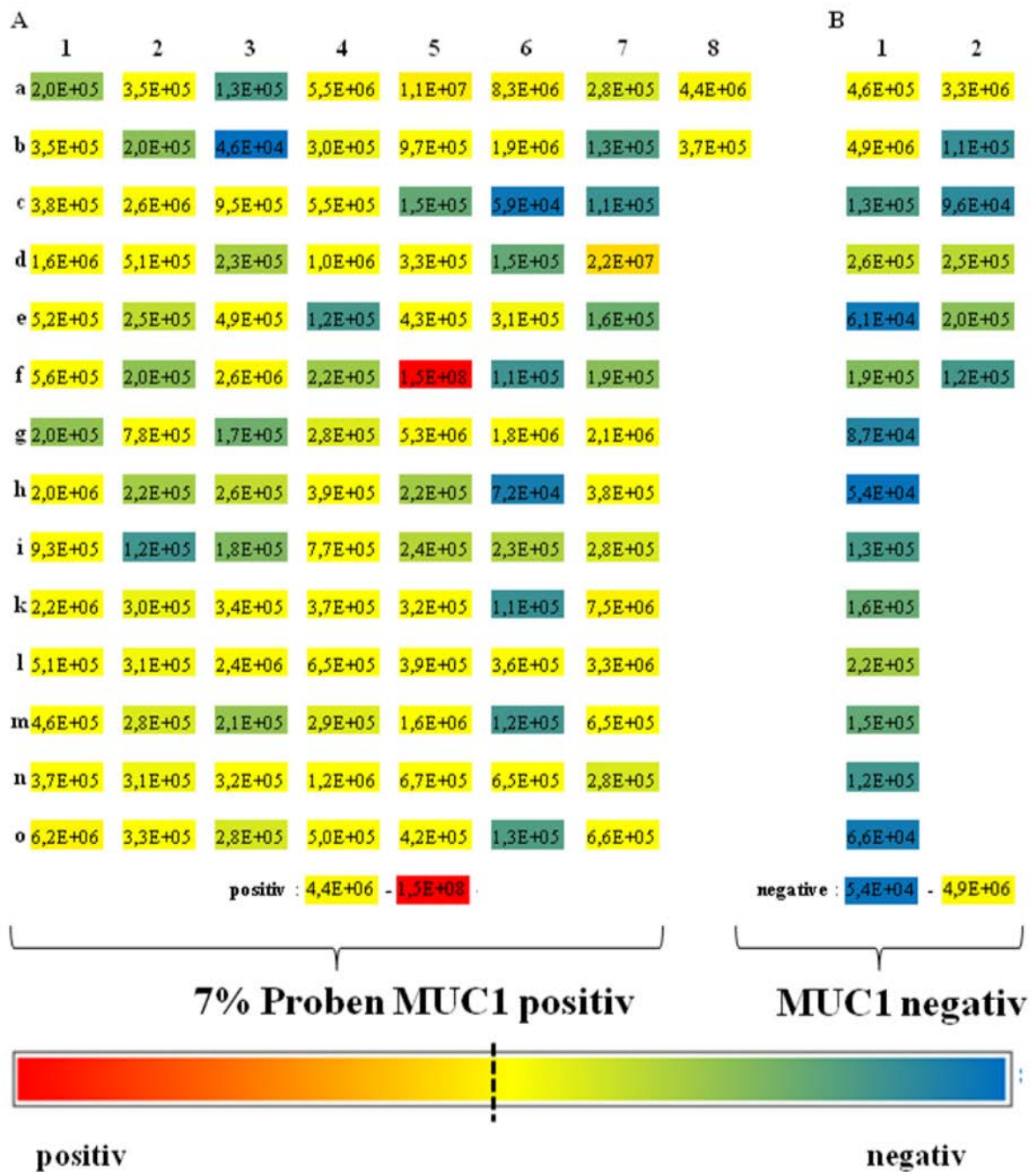
MUC1 ($^{159}\text{Tb}/^{115}\text{In}$)

Abbildung 40 Zeigt eine farbkodierte Darstellung (3-Farben-Saker) der erzeugten Peakflächen [counts] der LA-ICP-MS für den potentiellen Tumormarker MUC1. Der anti-MUC1-Antikörper wurde mit MeCAT(^{159}Tb)-modifiziert und in einem 8-fach Multiplex-Ansatz eingesetzt.

Ebenfalls wurden drei weitere nicht Prostatakarzinom-spezifische Antikörper in dem 8-fach Multiplex-Ansatz eingesetzt. Für die Auswertung der drei MeCAT-modifizierten Antikörper; anti-Her-2-Antikörper MeCAT(^{174}Yb), anti-Aktin-Antikörper MeCAT(^{146}Nd) und anti-GAPDH-Antikörper MeCAT(^{166}Er) wurden die normierten Intensitätsprofile erzeugt (siehe Anhang: Abbildung 72-Abbildung 74).

Die Indium normierten Signale konnten mit folgende SBRs bestimmt werden; für anti-Aktin-Antikörper MeCAT($^{146}\text{Nd}/^{115}\text{In}$) von 2000 und für anti-GAPDH-Antikörper MeCAT($^{166}\text{Er}/^{115}\text{In}$) von 100 (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Zusammenfassung der SBRs für die Antikörper im 8-fach Multiplex-Ansatz nach In-Normierung.

Antikörper	MECAT	SBR
anti-Erg	^{153}Eu	200
anti-Androgenrezeptor	^{169}Tm	300
anti-AMACR	^{141}Pr	250
anti-PSMA	^{175}Lu	2000
anti-MUC1	^{159}Tb	400-4000
anti-Actin	^{146}Nd	2000
anti-GAPDH	^{166}Er	100
anti-Her2	^{174}Yb	-

Für eine detaillierte Auswertung der drei nicht Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper wurden die Peakflächen der Biopsieproben herangezogen (siehe Anhang: Tabelle 35-37) und in einer 2-Farben-Skala kodiert, um die Abweichung der Peakflächen zueinander grafisch darzustellen (siehe Anhang: Abbildung 75-77). Die relativen Standardabweichungen (RSD) wurden aus den Peakflächen der 120 Proben des TMA-Gewebeschnittes berechnet (siehe Tabelle 10), um die Schwankungen der Proben zueinander zu ermitteln.

Der MeCAT(^{174}Yb)-modifizierte anti-Her2-Antikörper wurde für eine einfache aber *absolute* negative Kontrolle für alle 120 Biopsieproben eingesetzt. Der Anti-Her2-Antikörper ist kein spezifischer Antikörper für die Prostatakarzinom Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes und sollte nur schwache Signalintensitäten geben. Für alle Biopsieproben konnte ein Indium normiertes Ytterbium Untergrundsignal von 400 cps detektiert werden (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.3 Abbildung 72). Außerdem konnte ein Peakflächenbereich für alle Biopsieproben von $2,1\text{E}+04$ bis $1,0\text{E}+06$ counts mit einer relativen Standardabweichung von 83% ermittelt werden (siehe Tabelle 10). Die hohe relative Standardabweichung für den MeCAT(^{174}Yb)-modifizierten anti-Her2-Antikörper, verdeutlicht

die Problematik der biologischen Varianz der 120 Biopsieproben, sowie die unterschiedliche Größe oder Gewebelücken in den Biopsieproben.

Die beiden MeCAT-modifizierten Antikörper, die gegen Haushaltsproteine gerichtet sind (anti-Aktin-AK MeCAT(^{146}Nd) und anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er)) wurden detektiert, um Schwankungen in der Gewebeschichtdicke oder Gewebelücken während der LA-ICP-MS auszugleichen. Wie erwartet konnten alle 120 Biopsieproben mit den modifizierten Antikörpern detektiert werden. Für den MeCAT(^{146}Nd)-modifizierten anti-Aktin-Antikörper konnten fast alle Proben mit einer maximalen Indium-normierten Intensitäten von 2×10^4 cps detektiert werden (siehe Anhang: Abschnitt 3.6.3, Abbildung 73). Es konnte ein Peakflächenbereich für alle Biopsieproben von $4,8\text{E}+05$ bis $2,0\text{E}+07$ counts, mit einer relativen Standardabweichung von 77%, ermittelt werden (siehe Tabelle 10). Hingegen zeigte der anti-GAPDH MeCAT(^{166}Er)-modifizierte Antikörper für fast alle Biopsieproben eine maximale Indium-normierte Intensität von 1×10^4 cps und einen Peakflächenbereich von $3,8\text{E}+04$ bis $1,0\text{E}+07$ counts mit einer relativen Standardabweichung von 135%.

Aufgrund der hohen relativen Standardabweichungen von 77% und 135% für die beiden Haushaltsproteine konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Protein-Konzentration bzw. Verteilung, pro Biopsieprobe ermittelt werden. Die relativen Standardabweichungen zeigen eine hohe biologische Varianz der Biopsieproben zueinander. Die untersuchten Haushaltsproteine sind so nicht als Korrekturfaktor für die Gewebelücken der TMA-Gewebeschnitte geeignet.

Tabelle 10 Zusammenfassung der berechneten Ergebnisse für die drei Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper: anti-Her2, anti-Aktin und anti-GAPDH.

Antikörper	Her2	Aktin	GAPDH
Peakflächenbereich (120 Biopsieproben) [counts]	2,1E+04 bis 1,0E+06	4,8E+05 bis 2,0E+07	3,8E+04 bis 1,0E+07
Mittelwert [counts]	1,8E+05	5,8E+06	8,3E+05
SD [counts]	1,5E+05	4,5E+06	1,1E+06
RSD [%]	83	77	135

Obwohl keine Korrelation zwischen der Verteilung der Haushaltsproteine und den Biopsieproben ermittelt werden konnte, war es uns möglich mit Hilfe des MeCAT(^{146}Nd)-

modifizierten anti-Aktin-Antikörpers, Gewebelücken in den 2 mm großen Biopsieproben mit einem Untergrundsignal von ca. 500 cps zu detektieren (siehe Abbildung 41).

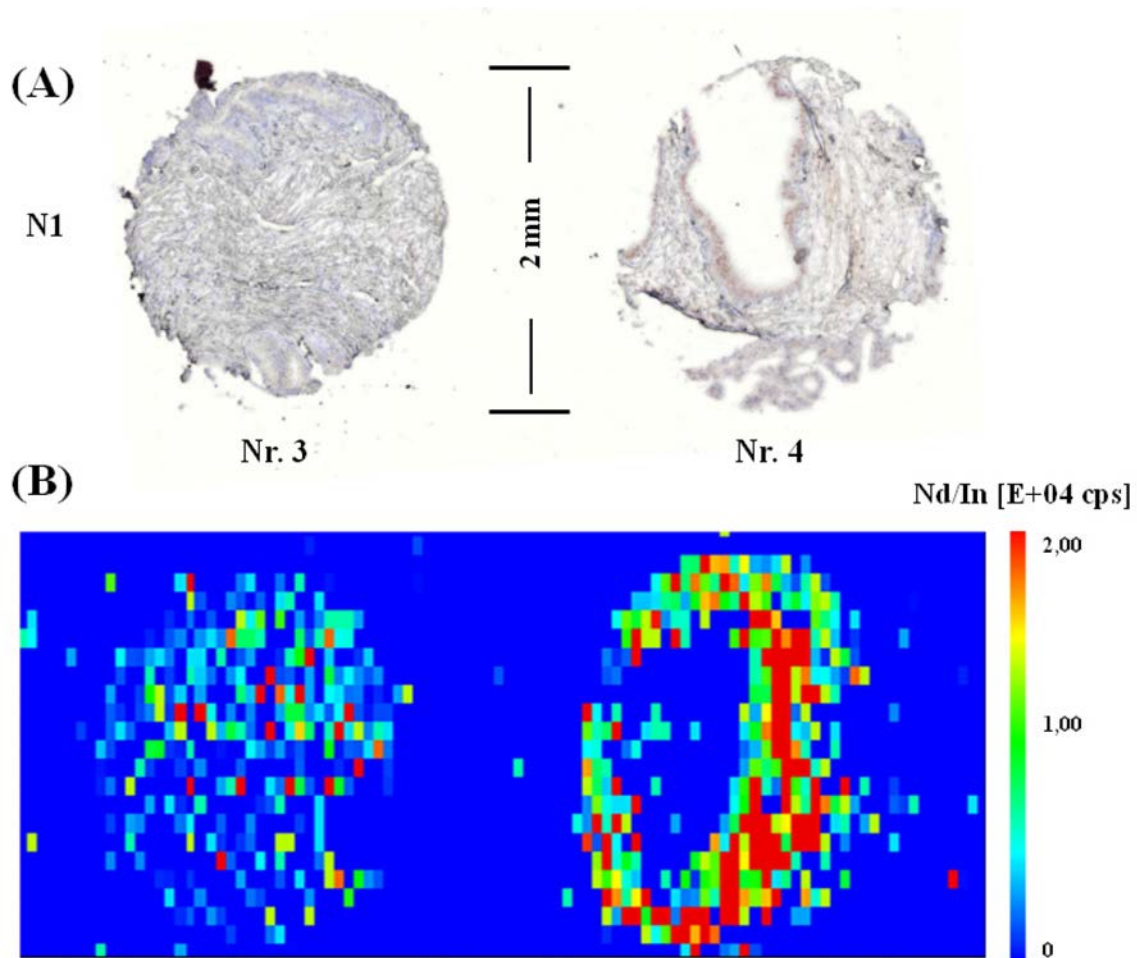


Abbildung 41 Zeigt zwei vergrößerte Ausschnitte eines Indium-normierten Neodym-Intensitätsprofils des anti-Aktin-Antikörpers (B) zweier Biopsieproben im direkten Vergleich zum lichtmikroskopischen Bild (A). Bei den Vergrößerungen handelt es sich um die dritte und vierte Biopsieprobe (Durchmesser 2 mm) der Reihe B 2d des im Anhang gezeigten TMA-Gewebeschnittes (siehe Abbildung 73).

Es konnten noch keine Strukturinformationen der Biopsieproben mit Hilfe der eingesetzten Antikörpern und einer Auflösung von 35 μm erhalten werden. Derzeit kann mit dem von uns verwendeten Lasersystem, eine maximale Auflösung von 5 μm erzielt werden. Um diese hohe Auflösung auch praktisch zu realisieren, müssen neue, noch nachweisstärkere Markierungsreagenzien entwickelt werden.

3.6.4 Vergleich zwischen IHC vs LA-ICP-MS

Für einen direkten Vergleich wurden für die vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper kommerzielle IHC-Färbungen unter denselben Bedingungen, wie für die LA-ICP-MS durchgeführt (siehe Abschnitt 5.5.1). Dies führte dazu, dass die IHC-Färbung für die vier Antikörper nicht aussagekräftig sind, da es zu falschen positiven Signalen für die Kontrollproben kam (siehe Tabelle 11). Während die LA-ICP-MS Detektion Signalintensitätsunterschiede zwischen den Kontrollproben (Normalgewebe B1-2) und den Prostatakarzinom Biopsieproben (A1-8), um einem Faktor von 20 bis 200 zeigt.

Von den 100 Prostatakarzinom-Proben (A1-8) wurden 67% mit positiven Erg Status, 52% mit positiven Androgenrezeptor Status, 90% mit positiven PSMA Status und 91% mit positiven AMACR Status mittels LA-ICP-MS detektiert (siehe Abbildung 36-39, Tabelle 11). Die Ergebnisse der LA-ICP-MS Detektion finden eine sehr gute Übereinstimmung mit den IHC Ergebnissen der Literatur.

In der Literatur werden für Prostatakarzinom-Proben 40-70% mit positiven Erg Status [165], 50% mit positiven Androgenrezeptor Status [166], 90% mit positiven PSMA Status [167] und 88% mit positiven AMACR Status [168] beschrieben.

Tabelle 11 Zusammenfassung der IHC-Färbung und LA-ICP-MS Ergebnissen unter mittleren Bedingungen im direkten Vergleich zu den literarischen IHC Ergebnissen, unter optimierten Bedingungen.

	anti-ERG AK positiv [%]	anti-Androgenrezeptor AK positiv [%]	anti-PSMA AK positiv [%]	anti-AMACR AK positiv [%]	
Konventionelle IHC Färbung (mittlere Bedingung)					
20 Kontrollproben	35	75	100	100	➡ nicht aussagekräftig (≠ 0 %)
100 Biopsieproben	74	73	98	98	
LA-ICP-MS					
MeCAT	Eu	Tm	Lu	Pr	
20 Kontrollproben	0	0	0	0	➡ aussagekräftig
100 Biopsieproben	67	52	87	91	
Literatur: Konventionelle IHC Färbung (optimale Bedingungen)					
20 Kontrollproben	0	0	0	0	➡ aussagekräftig
100 Biopsieproben	40-70	50	90	88	

Zusammenfassend konnte trotz mittlerer Reaktionsbedingungen (Demaskierung (pH 7,8)) und einer Auflösung von 35 μm , mit Hilfe von MeCAT-markierten Antikörpern, mehrere Biomarker gleichzeitig auf einem TMA-Gewebeschnitt, mittels LA-ICP-MS erfolgreich detektiert werden. Es war uns möglich, zwischen den 100 positiven Prostatakarzinom-Proben und den 20 Kontrollproben, mit guten SBRs zu unterscheiden (siehe Tabelle 9) und reale Zahlenwerte, in Form von Peakflächen für die einzelnen Biopsieproben, mit einem Durchmesser von 2 mm zu ermitteln. Aufgrund der begrenzten Signalintensität der Markierungsreagenzien konnte nur mit einer maximalen Auflösung von 35 μm detektiert werden, so dass keine Strukturinformationen, wie generell in der IHC-Färbung, ermittelt werden konnten. Um mit dem von uns verwendeten Lasersystem eine maximale Auflösung von 5 μm zu erzielen, müssen noch neue nachweisstärkere Markierungsreagenzien entwickelt werden.

3.7 8-fach Multiplex-Ansatz zur Untersuchung von neurodegenerativen Erkrankungen mittels LA-ICP-MS

3.7.1 Prinzip des 8-fach Multiplex-Ansatzes

In diesem Kapitel werden die zuvor entwickelten Methoden zur internen Standardisierung und Optimierung von Multiplex-Assays, mit MeCAT-markierten Antikörpern auf Gewebeproben in einem Hochdurchsatz 8-fach Multiplex-Assay für die LA-ICP-MS zusammengeführt. Bei dieser Anwendung wurden acht unterschiedliche MeCAT-modifizierte Antikörper zur Untersuchung von Morbus Parkinson-relevanten Biomarkern, in Mausgehirngewebeschnitten, mittels LA-ICP-MS eingesetzt. Zur Validierung dieser neuartigen, direkten immunologischen Detektionsmethode wurden kommerzielle immunohistochemische Färbungen (IHC) für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper eingesetzt. Die Untersuchung von Morbus Parkinson erfolgte an transgenen Mausmodellen, die das menschliche α -Synuclein-Gen überexprimieren, so dass es zur Bildung von Lewy-Körpern im Gehirn, in Nervenzellen und im Rückenmark kommt.

Die Expression oder Verminderung von verschiedenen Proteinen (Biomarkern), verursacht durch genetische-Modifikationen, ermöglicht die Identifizierung von neuen Faktoren bzw. Mechanismen, sowie die Entwicklung von neuen Behandlungsansätzen und Medikamenten.

Um den Einfluss der genetischen-Modifikation zu detektieren, werden nicht genetisch modifizierte Maustypen als direkte Kontrolle mit untersucht. Daher sind die detektierten Gewebeschnitte in zwei Gruppen gegliedert. Es gibt den sogenannten Wildtyp Maus (wt), der nicht modifizierte Typ als Referenz und der genetisch veränderte Homotyp Maus (ho). Zur Untersuchung des 8-fach Multiplex-Ansatzes wurden folgende vier Parkinson-spezifische Antikörper mit unterschiedlichen Elementen modifiziert; anti- α -Synuclein(204)-Antikörper mit MeCAT(Eu), anti-GFAP-Antikörper mit MeCAT(Ho), anti-NeuN-Antikörper MeCAT(Pr) und anti-TH-Antikörper MeCAT(Tb). Zur Detektion von erhöhter Phosphorylierung von Proteinen wurde ein anti-Phosphoserin-Antikörper mit MeCAT(Tm) modifiziert.

Um die Verteilung von unterschiedlichen Haushaltsproteinen in Gewebeschnitten zu untersuchen wurden folgende Antikörper; anti-Actin-Antikörper mit MeCAT(Nd), anti-GAPDH-Antikörper mit MeCAT(Er), anti-OxcT1-Antikörper mit MeCAT(Lu) modifiziert und zusätzlich eingesetzt. Die Wahl der vier Parkinson-spezifischen Antikörper, sowie die Präparation und Inkubation der 5 μ m dünnen FFPE Mausgehirngewebeschnitte, erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Dr. Theuring (Charité, Institut für Pharmakologie-CCR). Jeder der vier Parkinson-spezifischen Antikörper wurde unter denselben Bedingungen in einer konventionellen IHC an Parallelschnitten einzeln überprüft. Zusätzlich wurden alle Antikörper einzeln in einem Immunoassay für die LA-ICP-MS Analyse eingesetzt (siehe Abbildung 42).

Dies erlaubte einen Vergleich zwischen der konventionellen und der neuen Methode für die Gruppe der Parkinson-relevanten Antikörper. Ebenso ermöglicht der direkte Vergleich die Überprüfung der Antikörper auf unspezifische Bindungen, die durch die chemische Modifikation der Antikörper verursacht werden kann.

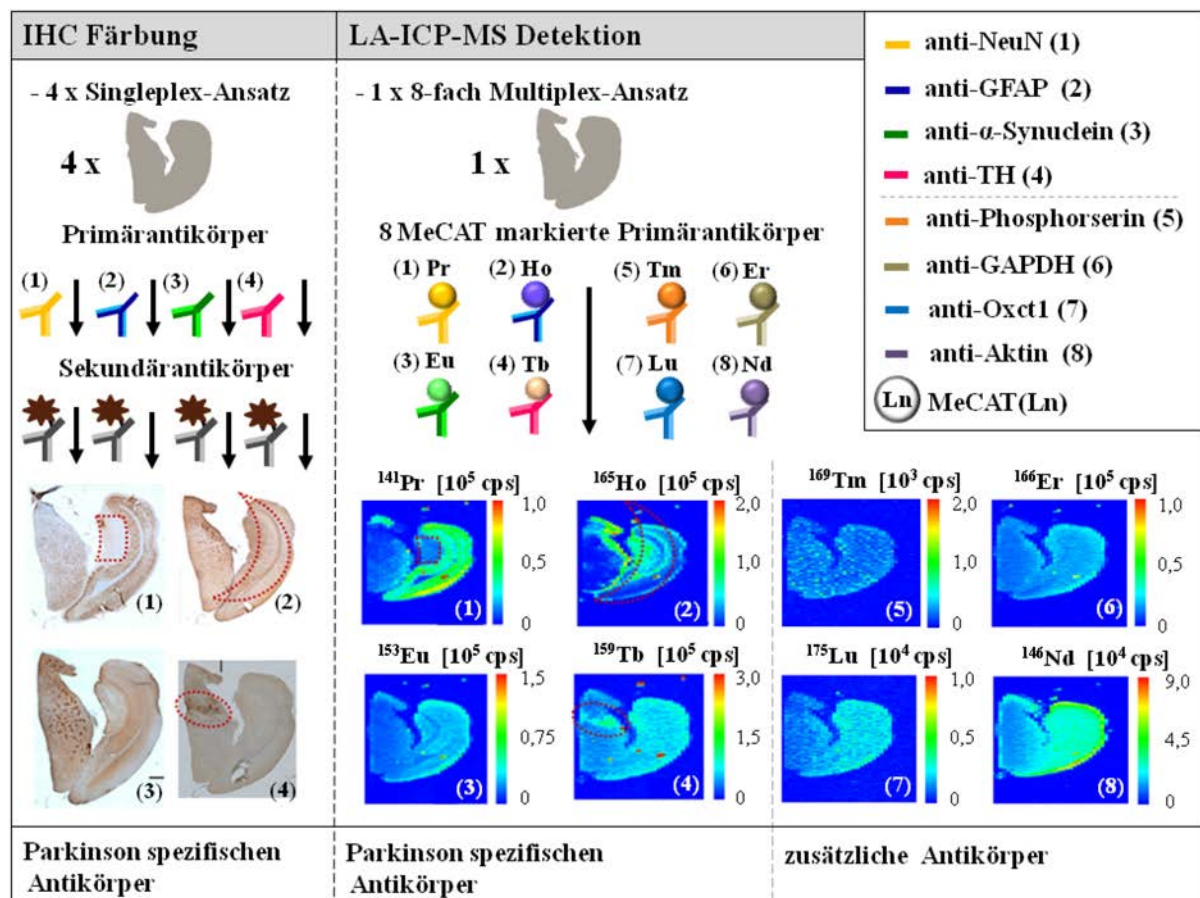


Abbildung 42 Schematische Darstellung der IHC-Färbungen im direkten Vergleich zu einem 8-fach Multiplex-Ansatz an Mausgehirngewebeschnitte. Für die IHC-Färbung wurden folgende Parkinson-spezifische Antikörpern (AK); (1) anti-NeuN-AK; (2) anti-GFAP-AK; (3) anti- α -Synuclein-AK und (4) anti-TH-AK eingesetzt. Die Färbung erfolgt im Singleplex-Ansatz durch einen Sekundärantikörper. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte als 8-fach Multiplex-Ansatz mit folgenden Antikörpern; (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(^{165}Ho); (3) anti-Synuclein-AK MeCAT(^{153}Eu) und (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb) zusätzliche Antikörper (5) anti-Phosphoserin-AK MeCAT(^{169}Tm); (6) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (7) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu) und (8) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd) eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wurde ein Mausgehirngewebeschnitt mit allen acht Antikörpern simultan inkubiert und mit der LA-ICP-MS detektiert. Die LA-ICP-MS Daten des Multiplex-Ansatzes können mit den Einzel-Ansätzen und den IHC-Färbungen verglichen werden.

Zur Standardisierung der LA-ICP-MS Daten wurde eine 4 mg L^{-1} Indium-gespickte gelbe Tinte mit einer 20%igen Druckdichte, als interner Standard, über die Adhäsions-Objektträger mit einem kommerziellen Tintenstrahldrucker gedruckt.

Diese Standardisierung wurde bereits auf Nitrozellulose (NC)-Membranen, sowie auf Superfrost Plus- Objektträgern (Thermo Fisher Scientific) erfolgreich erprobt und konnte bis zu einer Auflösung von 35 μm eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.4). Durch die Änderung des Trägermaterials von Superfrost Plus- Objektträgern zu SuperFrost(R) plus Adhäsions-Objektträgern, war eine einfache homogene Aufbringung der gespikten Tinte zur Standardisierung nicht möglich. Um trotzdem eine homogene Aufbringung zu ermöglichen, wurden die Mausgehirngewebeschnitte auf den Adhäsions-Objektträgern (SuperFrost® plus) mit Gelatine beschichtet (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.4.2.1) und anschließend mit dem interne Standard bedruckt. Pro Adhäsions-Objektträger sind zwei konsekutive Gewebeschnitte aufgebracht, so dass jeder Versuch als Doppelbestimmung erfolgte. Insgesamt wurden 176 Gewebeschnitte mit der LA-ICP-MS untersucht (siehe Material und Methoden, Tabelle 21).

Die Gewebeschnitte des Multiplex-Ansatzes wurden mit einer Auflösung von 35 μm , innerhalb von 8 h und mit einer Auflösung von 130 μm , innerhalb von 3 h, vollständig abgerastert. Um den hohen Satz an Daten schneller zu generieren wurden alle Singelplex-Ansätze mit einer Auflösung von 130 μm in Doppelbestimmung detektiert. Insgesamt wurden sechs Mausgehirngewebeschnitte mit einer Auflösung von 35 μm und 170 Mausgewebeschnitte mit 130 μm unter den oben beschriebenen Bedingungen vollständig analysiert. Aufgrund der hohen Datenmenge wurde nur für einen ausgewählten Probensatz (Probennummer 848 ho-Typ und 267 wt-Typ) exemplarisch ein 2D Intensitätsprofile mit den Auflösungen von 35 μm und 130 μm graphisch dargestellt (siehe Abbildung 46-47). Zur statistischen Absicherung wurden T-Tests für die 176 Gewebeschnitte durchgeführt und mit dem T-Test der IHC gefärbten Gewebeschnitte verglichen.

3.7.2 Überprüfung des internen Standards

Zu dem bereits validierten, gedruckten internen Standard wurden zusätzlich drei Haushaltsproteine, die unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium oder anderen Einflüssen konstant exprimiert werden, als interner Standard getestet. Es sollte geprüft werden, ob die ausgewählten Haushaltsproteine zur internen Standardisierung für die LA-ICP-MS Detektion geeignet sind. Die Haushaltsproteine sollten zur Korrektur von Schwankungen der Gewebeschichtdicke und Inhomogenität des Gewebes eingesetzt werden. Um die Verteilung der drei unterschiedlichen Haushaltsproteinen in Gewebeschnitten zu untersuchen wurden folgende Antikörper; anti-Aktin-Antikörper mit MeCAT(¹⁴¹Nd), anti-GAPDH-Antikörper mit MeCAT(¹⁶⁶Er), anti-OxcT1-Antikörper mit MeCAT(¹⁷⁵Lu)-modifiziert und zusätzlich in dem 8-fach Multiplex-Ansatz eingesetzt.

3.7.2.1 Anwendung der Haushaltsproteine als interner Standard mit einer Auflösung von 130 µm und 35 µm

Für die Auswertung der drei Haushaltsproteine wurden die normierten 2D Intensitätsprofile (siehe Abbildung 48) erzeugt und zur internen Standardisierung für die vier Parkinson-spezifischen Biomarker getestet (siehe Abbildung 43). Zur Beurteilung der internen Standardisierung mittels Haushaltsproteine wurden die standardisierten 2D Intensitätsprofile der vier Biomarker mit den IHC-Färbungen verglichen.

Für NeuN konnte das Fehlen des Proteins in einem kleinen Bereich (siehe rote Markierung in der Abbildung 43 (1A-C)), für GFAP eine typische Sichelform (siehe rote Markierung in der Abbildung 43 (2A-C)), für α -Synuclein eine relative homogene Proteinverteilung (siehe Abbildung 43 (3A-C)) und für TH eine kleine Proteinansammlung detektiert werden (siehe rote Markierung in der Abbildung 43 (4A-C)). Die normierten Intensitätsprofile zeigen die spezifischen Proteinansammlungen, bzw. Verringerungen der vier Parkinson Biomarker. Die Intensitätsprofile liefern, im Gegenteil zu den IHC-Färbungen, deutliche Signalschwankungen von links nach rechts über den gesamten Gewebeschnitt. Desweiteren sind sehr hohe Hintergrundsignale bzw. hohe Signale um den Gewebeschnitt in den normierten Intensitätsprofilen erkennbar. Die Normierung des Probensignals mit den

fehlenden Signalen der Haushaltsproteine außerhalb des Gewebeschnittes führt zur Erhöhung der Intensitäten (vgl. auch Abbildung 42).

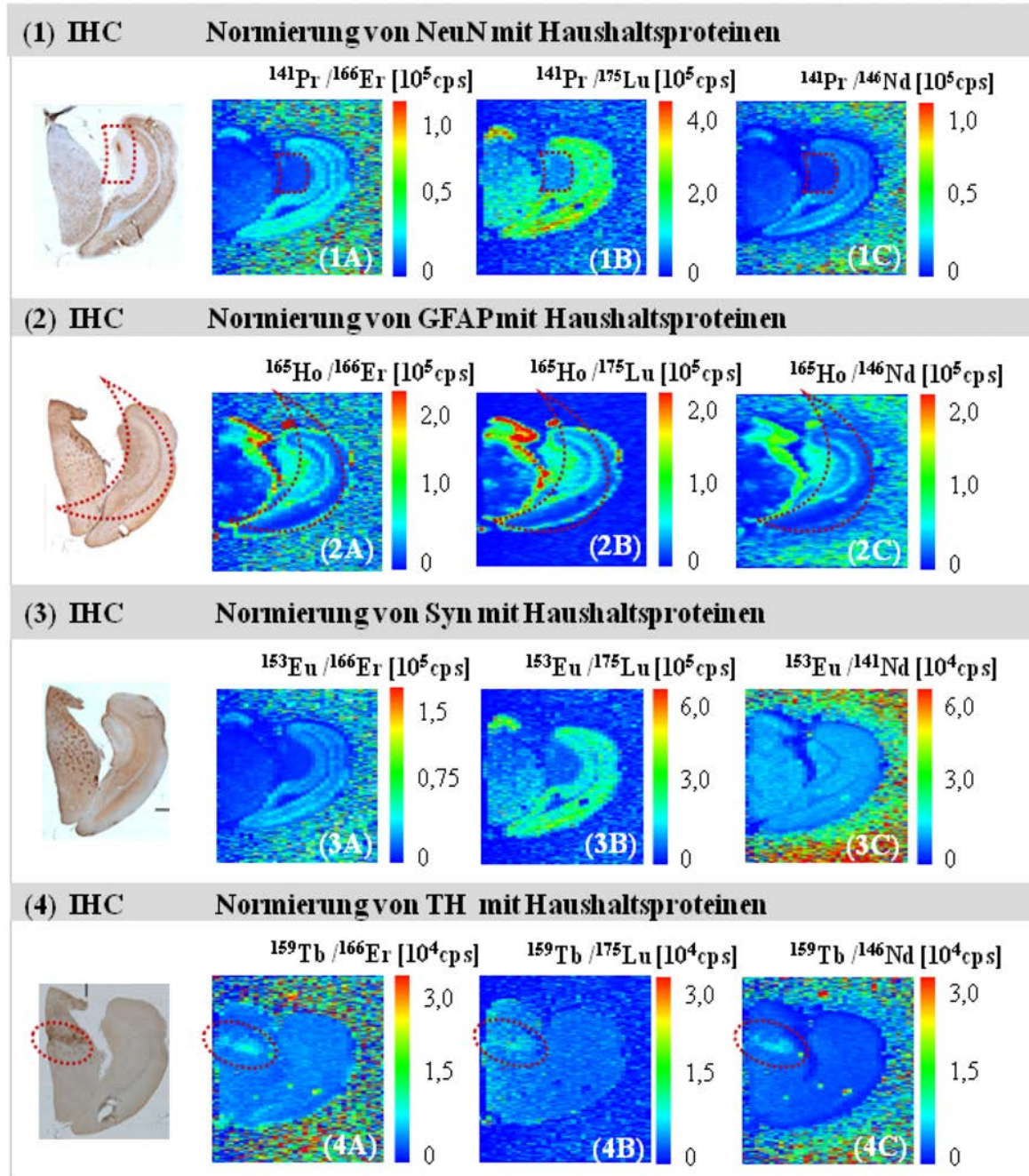


Abbildung 43 Zeigt die IHC-Färbung im direkten Vergleich zu den Intensitätsprofilen der vier Parkinson-spezifischen Antikörper (AK): (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb), die jeweils mit drei eingesetzten Haushaltsproteinen: (A) anti-GAPDH-AK MeCAT (^{166}Er); (B) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu), (C) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd) normiert wurden. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 150 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 130 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Für eine statistische Auswertung in Anlehnung zur IHC-Färbung müssen die Peakflächen durch Summierung der Signale in den Bereichen mit spezifischen Merkmalen berechnet werden. Die Berechnung der Peakflächen würde auch die unspezifischen Hintergrundsignale beinhalten, so dass die Peakflächen verfälscht würden. Daher sind die Haushaltsproteine als interne Standardisierung für die Detektion mit einer Auflösung von 130 μm , zur Korrektur der Gewebeschichtdicke und Inhomogenität des Gewebes, nicht geeignet. Die Haushaltsproteine, als Korrekturfaktor, fanden deshalb für die Auswertung der 170 Mausgehirngewebeschnitte keine Anwendung.

Zur Beurteilung der Haushaltsproteine als interner Standard erfolgten weitere Detektionen des 8-fach Multiplex-Ansatzes mit einer Auflösung von 35 μm . Die IHC-Färbung wurde als direkter Vergleich für die LA-ICP-MS Detektion herangezogen. Für die vier Parkinson-spezifischen Biomarker wurden normierte Intensitätsprofile mit den Haushaltsproteinen erzeugt (siehe Abbildung 44). Im direkten Vergleich zur IHC-Färbung liefern die normierten Intensitätsprofile identische Ergebnisse. Das normierte Intensitätsprofil für NeuN lieferte nur eine geringe Proteinverringering in einem kleinen Bereich (siehe rote Markierung in Abbildung 44 (1A-C)). Die typische Sichelform des GFAP-Proteins konnte ebenfalls mit einer geringen Signalintensität in den normierten Intensitätsprofilen beobachtet werden (siehe rote Markierung in Abbildung 44 (2A-C)). Eine homogene Proteinverteilung mit geringer Signalintensität konnte für das α -Synuclein-Protein ermittelt werden (siehe rote Markierung in Abbildung 44 (3A-C)). Für TH konnte nur eine schwach sichtbare kleine Proteinansammlung detektiert werden (siehe rote Markierung in Abbildung 44 (4A-C)). Zusätzlich zeigten alle normierten Intensitätsprofile keine störenden Hintergrundsignale. Daher ist eine statistische Auswertung in Anlehnung zur IHC-Färbung grundsätzlich möglich. Allerdings konnten die spezifischen Merkmale, bzw. Proteinansammlungen nach Normierung der vier Parkinson-spezifischen Proteine mit den drei Haushaltsproteinen nur mit einer geringen Signalintensität dargestellt werden. Aufgrund der schwachen Signalintensität und einer schlechten Akzentuierung der spezifischen Proteinansammlung, bzw. Verminderung, erfolgte keine statistische Auswertung. Für den Einsatz der Haushaltsproteine als interner Standard müssten nachweisstärkere Markierungsreagenzien entwickelt werden, so dass höhere Signalintensitäten bei der Detektion, mit einer Auflösung von 35 μm erzielt werden können. Zusätzlich müssten noch weitere Untersuchungen bezüglich einer homogenen

Verteilung der Haushaltsproteine erfolgen. Daher wurden die Haushaltsproteine im Weiteren nicht als interner Standard für die 6 Mausgehirngewebeschnitte eingesetzt.

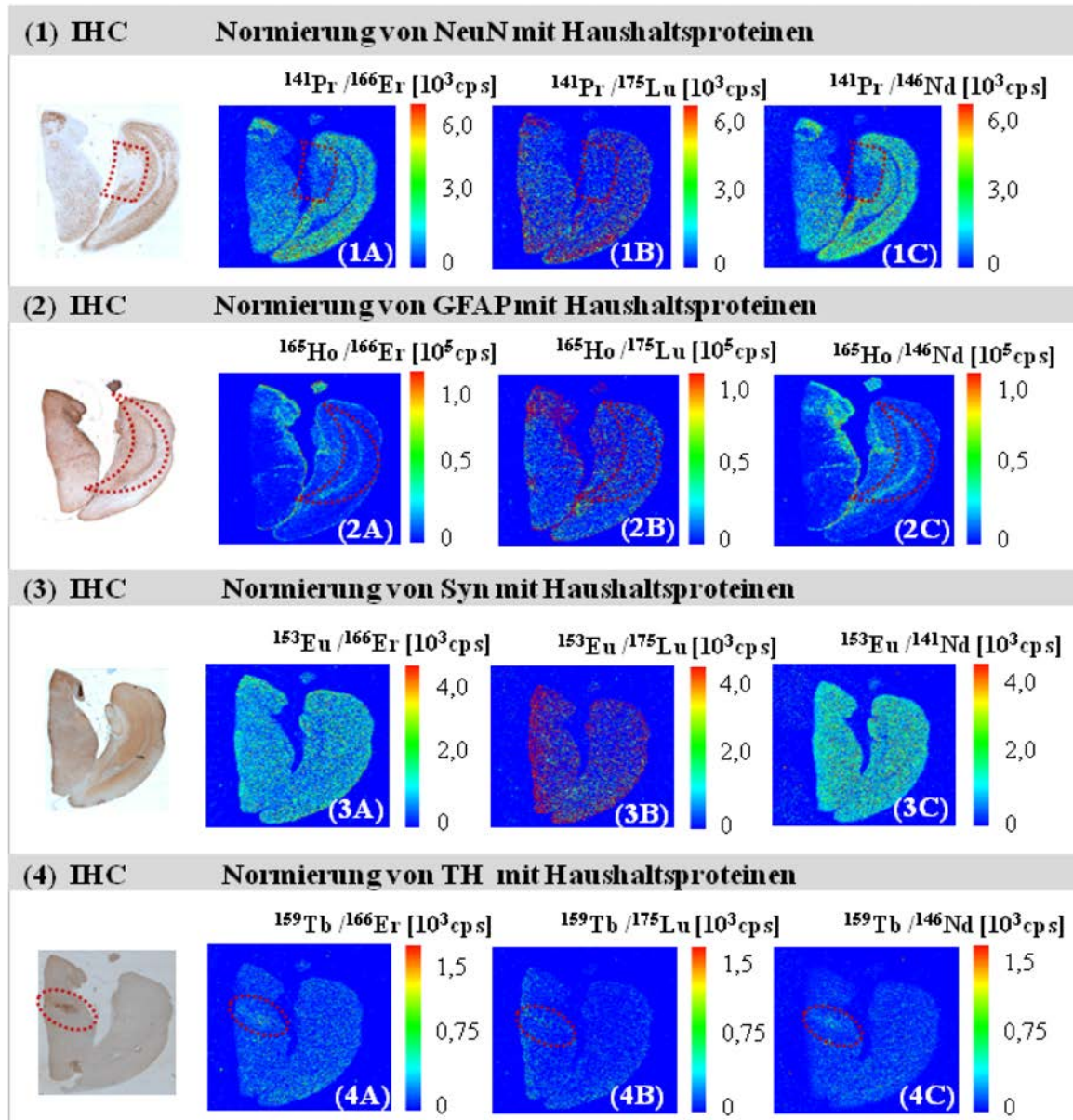


Abbildung 44 Zeigt die IHC-Färbung im direkten Vergleich zu den Intensitätsprofilen der vier Parkinson-spezifischen Antikörper (AK): (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb), die jeweils mit drei eingesetzten Haushaltsproteinen: (A) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (B) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu), (C) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd) normiert wurden. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 50 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

3.7.2.2 Überprüfung des Indium gedruckten internen Standards auf der Gelatinebeschichtung

3.7.2.2.1 Visuelle Überprüfung des Druckprozesses

Das homogene Bedrucken von FFPE Mausgehirngewebe auf SuperFrost® plus Adhäsions-Objektträgern mit einer Indium-gespickten Tinte als interner Standard ist aufgrund der hydrophoben Beschichtung des Objektträgers nicht so einfach möglich. Die Tinte perlt von den Objektträgern ab (siehe Abbildung 45 (1)). Daher wurden die Adhäsions-Objektträger mehrmals mit unterschiedlich konzentrierten Gelatinelösung (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.4.2.1) beschichtet und für das homogene Bedrucken erprobt. Nach der Gelatinebeschichtung wurde der interne Standard auf die Objektträger gedruckt und mit unterschiedlichen Parametern mittels LA-ICP-MS detektiert (siehe Abbildung 45(2)-(4)).

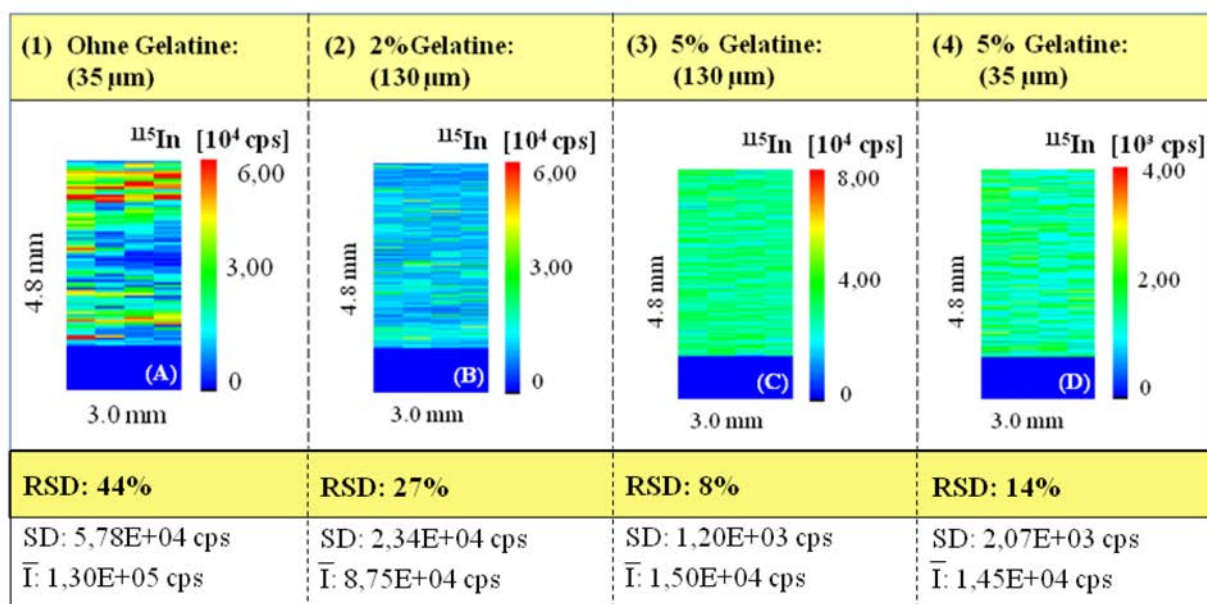


Abbildung 45 Intensitätsprofile zur Optimierung des Druckprozesse des internen Standards auf SuperFrost® plus Adhäsions-Objektträgern durch Variierung der Gelatinebeschichtungen und der Berechnung der relativen Standardabweichung (RSD), zur Beurteilung der homogenen Druck-Beschichtung. (1) ohne Gelatine mit einer Auflösung von 35 µm, (2) 2%ige Gelatinebeschichtung mit einer Auflösung von 130 µm, (3) 5%ige Gelatinebeschichtung mit einer Auflösung von 130 µm und (4) 5%igen Gelatinebeschichtung mit einer Auflösung von 35 µm. Die SuperFrost® plus Adhäsions-Objektträgern wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 50 µm und 150 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm s⁻¹ und 150 µm s⁻¹, Auflösung von 35 µm und 130 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Das Intensitätsprofil der Abbildung 45(1) zeigt keine homogene Verteilung des gedruckten internen Standards auf den SuperFrost^(R) plus Adhäsions-Objektträger. Dies konnte durch die Berechnung der RSD von 44% (SD: 5,78E+04 cps, \bar{I} : 1,30E+05 cps) bestätigt werden. Durch die Beschichtung mit einer 2%igen Gelatine-Lösung konnte mit einer Auflösung von 130 μm eine RSD von 27% (SD: 2,34E+04 cps, \bar{I} : 8,75E+04 cps) erzielt werden (siehe Abbildung 45(2)). Für eine weitere Verbesserung der Homogenität des gedruckten internen Standards wurde eine 5%ige Gelatine-Lösung eingesetzt und mit einer Auflösung von 130 μm detektiert. Es konnte eine signifikante Verbesserung der Homogenität des internen Standards mit einer RSD von 8% (SD: 1,20E+03 cps, \bar{I} : 1,50E+04 cps) erzielt werden. Durch die 5%ige Gelatinebeschichtung ist eine Steigerung der Auflösung von 130 μm auf 35 μm möglich (Abbildung 45(3) und (4)). Das Intensitätsprofil der Abbildung 45(4) zeigte eine ausreichende homogene Aufbringung des gedruckten internen Standards mit einer Auflösung von 35 μm und einer RSD von 14% (SD: 2,07E+04 cps, \bar{I} : 1,45E+04 cps). Durch die 5%ige Gelatinebeschichtung der SuperFrost^(R) plus Adhäsions-Objektträger konnte das Abperlen der Tinte verhindert werden und es wurde deshalb für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Eine Vorbehandlung des Gewebeschnittes war nur notwendig wenn SuperFrost^(R) plus Adhäsions-Objektträger von der Firma R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, als Trägermaterial eingesetzt wurden.

3.7.2.2.2 Anwendung des gedruckten Standards auf Mausgehirngewebeschnitten bei einer Auflösung von 130 μm und 35 μm

Zur Beurteilung des gedruckten internen Standards auf der Gelatinebeschichtung wurde diese für eine Detektion mit einer Auflösung von 130 μm bei einem 8-fach Multiplex-Ansatz angewendet und getestet. Zu diesem Zweck wurden für die vier Parkinson-spezifischen Biomarker normierte Intensitätsprofile erzeugt und mit den entsprechenden IHC-Färbung verglichen (siehe Abbildung 46). Es konnten für die vier Biomarker die spezifischen IHC gefärbten Proteinmerkmale mittels LA-ICP-MS detektiert werden (siehe Abbildung 46). Die normierten Intensitätsprofile zeigen für den Biomarker NeuN das Fehlen des Proteins in einem kleinen Bereich (siehe rote Markierung in der Abbildung 46(1B)), für GFAP eine typische Sichelform (siehe rote Markierung in der Abbildung 46(2B)), für α -Synuclein eine relativ homogene Proteinverteilung (siehe Abbildung 46(3B)) und für TH eine kleine

Proteinansammlung (siehe rote Markierung in der Abbildung 46(4B)). Zusätzlich zeigten die normierten Intensitätsprofile keine signifikanten Hintergrundsignale, so dass eine statistische Auswertung der spezifischen Proteinbereiche möglich ist. Daher wurden die Peakflächen der spezifisch gefärbten Proteinmerkmale aus den 170 Indium-normierten Intensitätsprofilen mit einer Auflösung von 130 μm für die statistische Absicherung ermittelt (siehe Abschnitt 3.7.5, Tabelle 14).

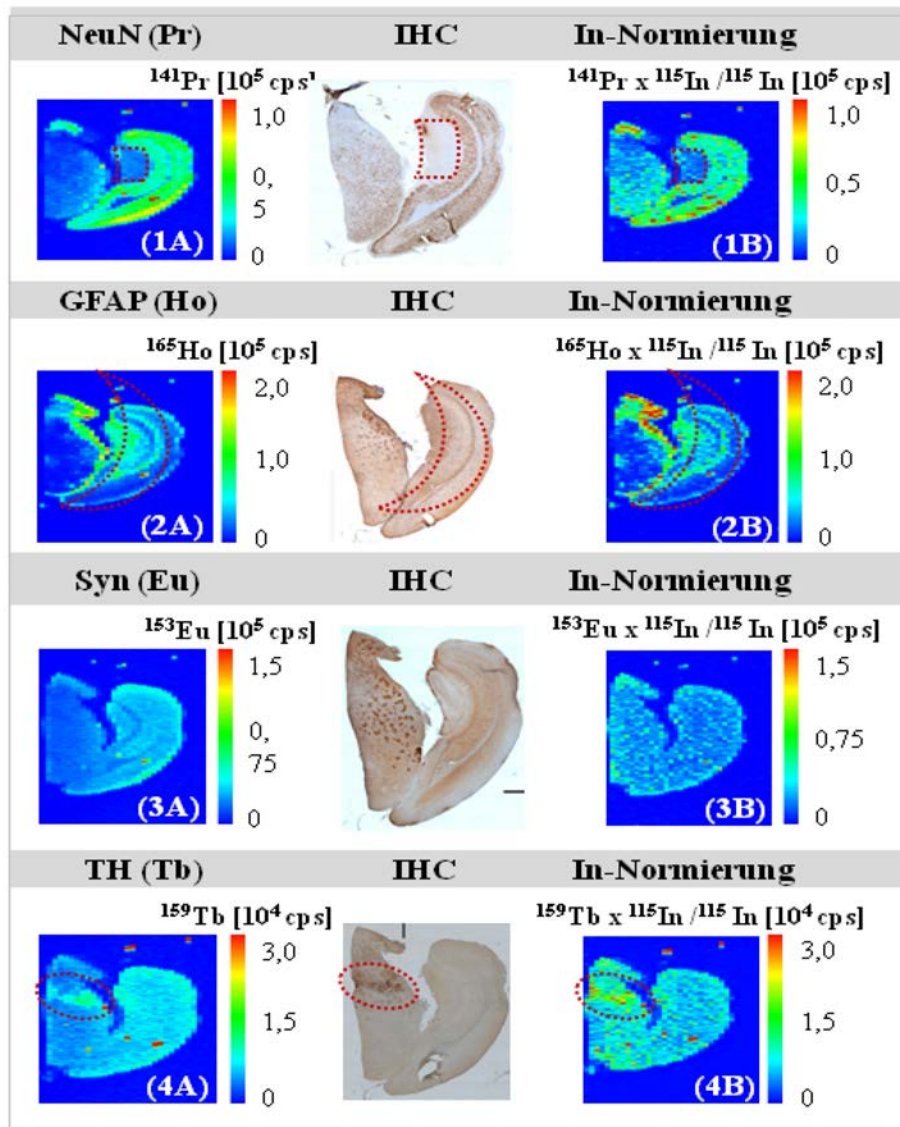


Abbildung 46 Zeigt für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper die Intensitätsprofile (A), die IHC-Färbung und die ^{115}In -normierten Intensitätsprofile (B). (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 150 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 $\mu\text{m s}^{-1}$, Auflösung 130 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Um die Auflösung von 130 μm auf 35 μm zu verbessern, wurde ein weiterer 8-fach Multiplex-Ansatz mit dem gedruckten internen Standard detektiert. Für die vier Parkinson-spezifischen Biomarker wurden die normierten Intensitätsprofile erzeugt und mit den entsprechenden IHC-Färbung verglichen (siehe Abbildung 47).

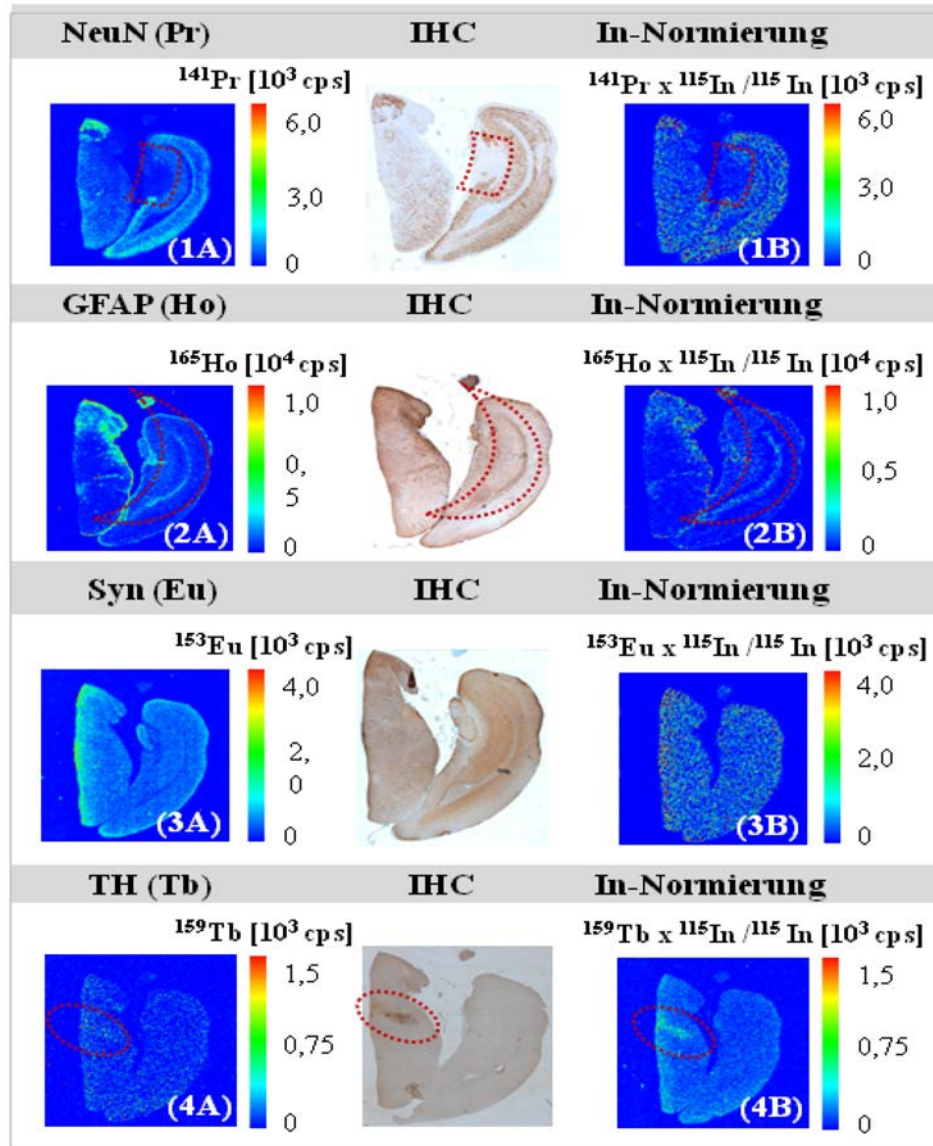


Abbildung 47 Zeigt für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper die Intensitätsprofile (A), die IHC-Färbung und die ^{115}In -normierten Intensitätsprofile (B). (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 50 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Im direkten Vergleich konnten identische IHC gefärbte Proteinmerkmale für die vier Biomarker mittels LA-ICP-MS detektiert werden (siehe Abbildung 47). Für den Biomarker NeuN konnte das Fehlen des Proteins in einem kleinen Bereich (siehe rote Markierung in der Abbildung 47(1B)), für GFAP eine typische Sichelform (siehe rote Markierung in der Abbildung 47(2B)), für α -Synuclein eine relative homogene Proteinverteilung (siehe Abbildung 47(3B)) und für TH eine kleine Proteinansammlung (siehe rote Markierung in der Abbildung 47(4B)) detektiert werden. Die detektierten Proteinmerkmale der vier Biomarker zeigten hohe Probensignale ohne Hintergrundsignale, so dass eine statistische Auswertung der spezifischen Biomarker Bereiche einfach möglich ist.

Daher wurden die mit einer Auflösung von 35 μm detektierten 6 Mausgehirngewebeschnitte, mit Indium normiert und die Peakflächen der spezifischen Proteinmerkmale für eine statistische Absicherung herangezogen.

3.7.2.3 Vergleich der internen Standards: Haushaltsproteine vs. gedrucktem Indium

Zusätzlich zum gedruckten internen Standard wurden zusätzlich drei Haushaltsproteine die unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium oder anderen Einflüssen, konstant exprimiert werden, als interner Standard erprobt. Es sollte geprüft werden, ob die LA-ICP-MS Detektion der ausgewählten Haushaltsproteine geeignet ist, um die Schwankung der Gewebeschichtdicke und Inhomogenität des Gewebes, sowie das teilweise Fehlen von Gewebebereichen, auszugleichen, so dass diese als Korrekturfaktor eingesetzt werden könnten. Zu diesem Zweck wurde die Verteilung der drei unterschiedlichen Haushaltsproteine in Gewebeschnitten, im Vergleich zum gedruckten internen Standard untersucht. Folgende Antikörper; anti-Aktin-Antikörper mit MeCAT(^{141}Nd), anti-GAPDH-Antikörper mit MeCAT(^{166}Er), anti-OxcT1-Antikörper mit MeCAT(^{175}Lu) wurden modifiziert und zusätzlich in dem 8-fach Multiplex-Ansatz eingesetzt.

Die Rohdaten der Intensitätsprofile der vier Haushaltsproteine zeigen eine relativ homogene Verteilung, mit einer Signalzunahme von links nach rechts, über die gesamte Gewebefläche für die Detektion mit einer Auflösung von 130 μm . Während die Rohdaten der Haushaltsproteine mit einer Auflösung von 35 μm eine Signalabnahme von links nach rechts

zeigen (siehe Abbildung 48(1-3)). Zusätzlich konnte mit beiden Auflösungen für Aktin ein erhöhtes Signal am Rand der Mausgehirngewebeschnitte beobachtet werden (siehe Abbildung 48(3)).

Für die Rohdaten der Intensitätsprofile der vier Haushaltsproteine konnten keine signifikanten Hintergrundsignale für beide Auflösungen detektiert werden. Der gedruckte interne Standard zeigt ebenfalls eine relative homogene Verteilung mit einer Signalzunahme von links nach rechts für die Auflösung von 130 μm und eine Signalabnahme von links nach rechts für 35 μm (siehe Abbildung 48(4)). Die Anwendung des gedruckten internen Standards auf die Haushaltsproteine zeigt eine deutliche Verbesserung der homogenen Signalverteilung im Gewebeschnitt (siehe Abbildung 48(5-7)) und korrigiert erfolgreich die Signalschwankungen für beide Auflösungen.

Zur Überprüfung der Haushaltsproteine und des gedruckten internen Standards wurden diese zur Normierung der vier Parkinson-spezifischen Biomarker eingesetzt (siehe Abbildung 43-Abbildung 44; Abbildung 46-47). Die Intensitätsprofile nach der Normierung mit den Haushaltsproteinen zeigten bei einer Detektion mit einer Auflösung von 130 μm sehr hohe Hintergrundsignale. Die fehlenden Signale der Haushaltsproteine außerhalb des Gewebeschnittes, führen bei der Normierung zur Erhöhung der Biomarkersignale um den Gewebeschnitt herum. Während die Normierung mit den Haushaltsproteinen bei einer Auflösung von 35 μm keine Hintergrundsignale lieferte. Es konnten nur schwache Probensignale für die Proteinmerkmale der vier Biomarker detektiert werden. Daher konnten die Haushaltsproteine nicht als interne Standards genutzt werden. Um die Haushaltsproteine für eine höhere Auflösung nutzbar zu machen müssen nachweisstärkere Markierungsreagenzien entwickelt werden.

Der bereits validierte, gedruckte interne Standard wurde für die Untersuchung von Parkinson an den Mausmodellen durch eine vorherige 5%ige Gelatinebeschichtung der Mausgehirngewebeschnitte modifiziert. Nach Optimierung der Gelatinebeschichtung konnte die Indium-versetzte Tinte homogen auf den Gewebeschnitt aufgebracht werden. Die Intensitätsprofile nach der Normierung mit dem gedruckten internen Standard zeigten bei einer Detektion mit einer Auflösung von 130 μm und 35 μm keine störenden Hintergrundsignale. Für beide Auflösungen konnten die Proteinmerkmale gut detektiert werden, so dass eine einfache Peakflächen-Berechnung für eine statistische Absicherung und ein direkter Vergleich mit der IHC-Färbung möglich war. Daher erfolgte die weitere

Auswertung der 176 Mausgehirngewebeschnitte nach Normierung auf den gedruckten internen Standard.

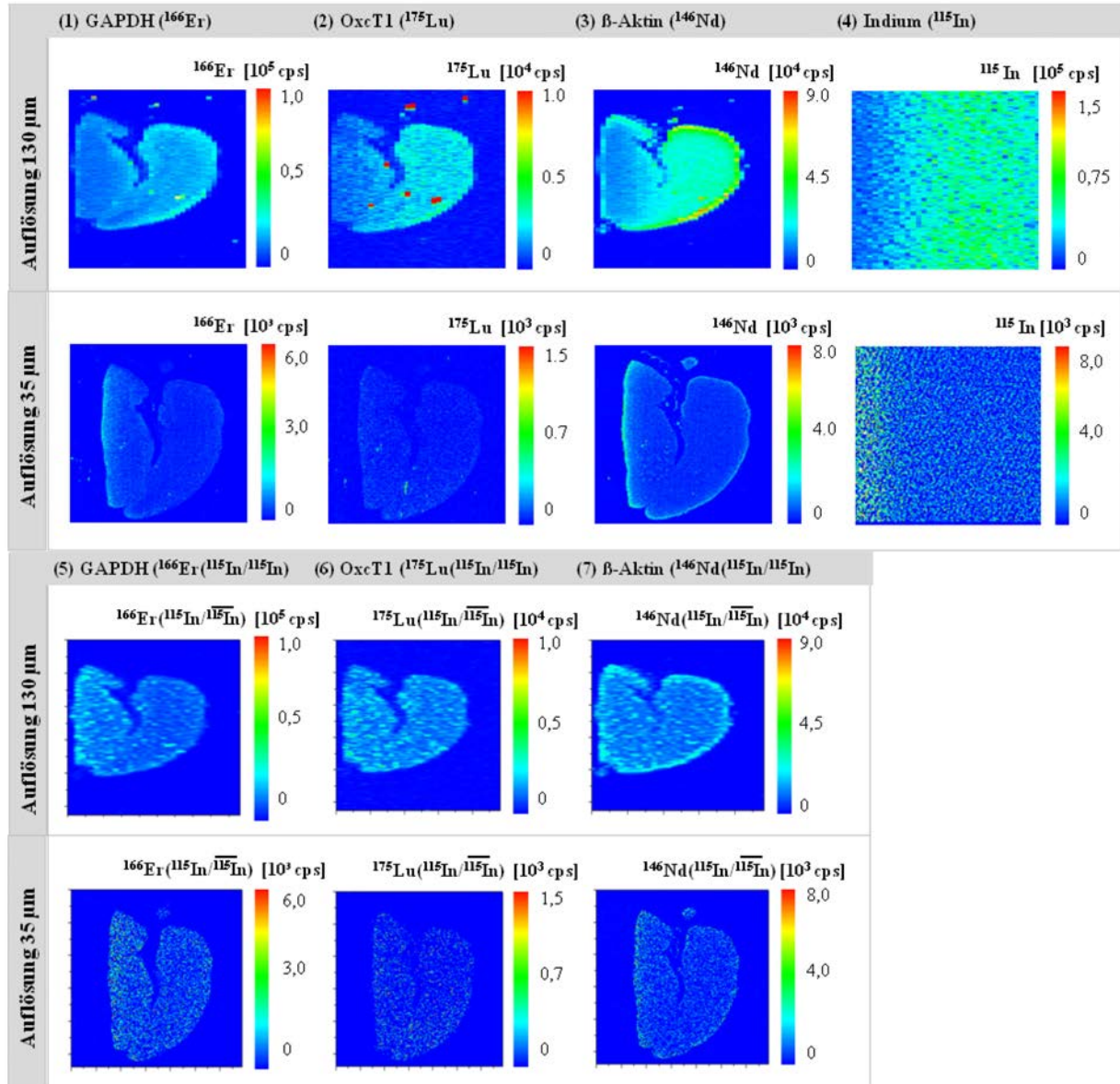


Abbildung 48 Zeigt die Intensitätsprofile der drei Haushaltsproteine. (1) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (2) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu), (3) anti-β-Aktin-AK MeCAT(^{146}Nd) und den (4) gedruckten Internen Standard ^{115}In in zwei unterschiedlichen Auflösungen. Die Intensitätsprofile (5-7) zeigen die Anwendung der gedruckten internen Standards auf die drei Haushaltsproteine. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 150 µm und 50 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 µm s⁻¹ und 50 µm s⁻¹ und einer Auflösung von 135 µm und 35 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

3.7.3 IHC-Färbung an Mausgehirngewebeschnitten mit Parkinson-spezifischen Antikörpern im Einzelnachweis

Für die Untersuchung von Morbus Parkinson wurden insgesamt 152 FFPE Mausgehirngewebeschnitte, mittels kommerzieller IHC-Färbung im Arbeitskreis von Prof. Dr. Theuring analysiert. Die Mausgehirngewebeschnitte gliedern sich in genetischen-modifizierten Homotyp Maus (ho) und den unbehandelten Wildtyp Maus (wt) als Referenz. Um den Einfluss der genetischen Veränderung zu detektieren wurden 92 Gewebeschnitte vom ho-Typ und 84 Gewebeschnitte vom wt-Typ, mit Hilfe der folgenden Parkinson-spezifische Antikörper; anti- α -Synuclein(204)-Antikörper, anti-GFAP-Antikörper, anti-NeuN-Antikörper und anti-TH-Antikörper untersucht (siehe Material und Methoden: Abschnitt 5.5.2, Tabelle 21). Aufgrund der hohen Datenmenge werden nur die IHC-Färbungen der Probennummer 848 ho-Typ und 267 wt-Typ exemplarisch gezeigt (siehe Abbildung 49).

Die IHC-Färbung des ho-Typs zeigt eine signifikante Verringerung des NeuN-Proteins im direkten Vergleich zum wt-Typ. Diese Verringerung befindet sich in einem kleinen, rot markierten Bereich auf der rechten Hälfte des Mausgehirngewebeschnitts (siehe Abbildung 49). Die Detektion des GFAP-Proteins zeigt die typische Sichelform im ho- und wt-Typ. In dem rot markierten sichelförmigen Bereich kann eine höhere GFAP-Proteinmenge für den ho-Typ im Vergleich zum wt-Typ beobachtet werden. Für das α -Synuclein-Protein konnte eine relativ homogene Verteilung in dem IHC gefärbten Mausgehirngewebeschnitt ermittelt werden. Der ho-Typ zeigt eine signifikant höhere Verteilung des α -Synuclein-Proteins als der wt-Typ. Die IHC-Färbungen des TH-Proteins zeigen signifikant höhere Proteinansammlung auf der linken Seite des Mausgehirngewebeschnittes (siehe Abbildung 49, rot markiert). Visuell konnte eine gering höhere Proteinansammlung im wt-Typ Maus beobachtet werden. Für eine aussagekräftige Auswertung der 152 IHC gefärbten Mausgehirngewebeschnitte wurde für die beiden Proteine NeuN und GFAP eine automatische Ermittlung der signifikant, gefärbten Flächen anhand der Graustufen mit dem Programm ImageJ bestimmt. Während für die Auswertung der beiden Proteine α -Synuclein und TH die IHC gefärbten Zellen manuell gezählt wurden (siehe Anhang: Tabelle 38-39). Für eine statistische Absicherung der Datenanalyse wurde für die zwei Gruppen ho- und wt- Typ des jeweiligen Proteins, ein T-Test durchgeführt. Dafür wurde die Statistik-Software GraphPad Prism mit folgenden Einstellungen gewählt; zweiseitige Verteilung, zwei Stichproben mit gleicher Varianz. Der T-Test dient zur Ermittlung von

signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Mittelwerten der Peakflächen der ho- und wt-Typ Mausgehirngewebeschnitte. Die manuelle und automatische Auswertung sowie die statistische Absicherung der vier Parkinson-spezifischen Antikörper via IHC-Färbung der ho- und wt-Typ Mausgehirngewebeschnitte, wurde im Vorfeld im Arbeitskreis von Prof. Dr. Theuring intern erprobt und validiert.

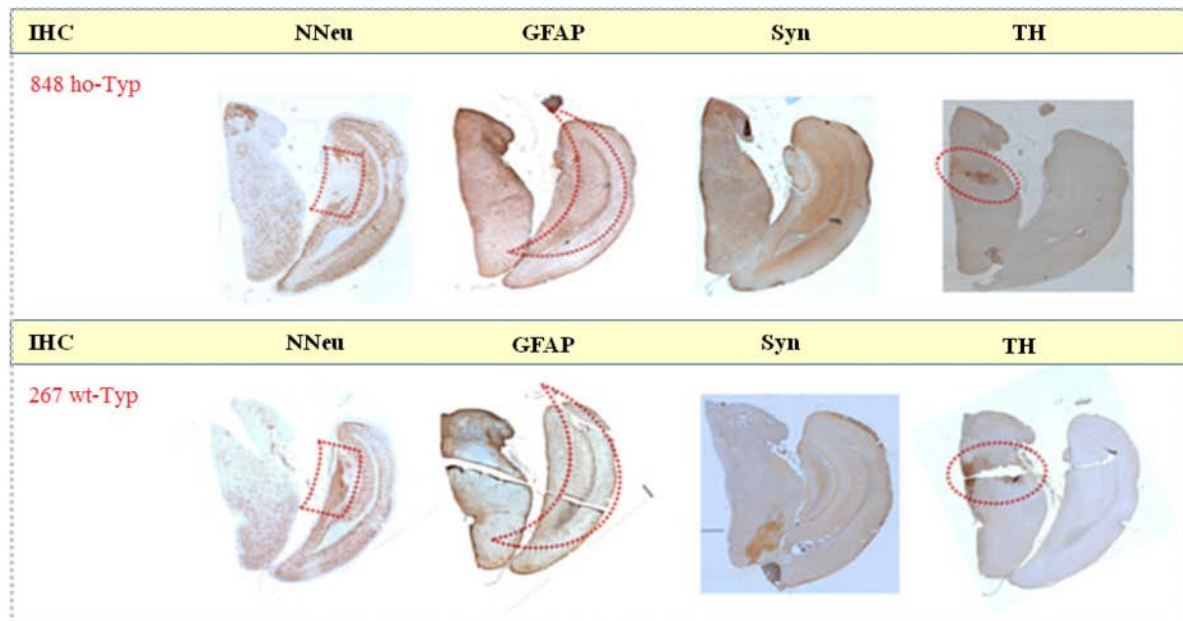


Abbildung 49 Zeigt die Immunhistochemische Färbungen (indirekte immunologische Methode) von 5 µm dünnen Mausgehirngewebeschnitten von genetisch verändertem Homotyp Maus (ho) im direkten Vergleich zum Wildtyp Maus (wt) als unbehandelte Referenz zur Untersuchung von Parkinson. Es wurden folgende Parkinson-spezifische Antikörper; anti- α -Synuclein (204)-Antikörper (Syn), anti-GFAP-Antikörper, anti-NeuN-Antikörper und anti-TH-Antikörper eingesetzt.

Die Ergebnisse der 152 IHC gefärbten Mausgehirngewebeschnitten sind in der Tabelle 12 zusammengefasst und bestätigen die visuell ermittelten Ergebnisse.

Tabelle 12 Zusammenfassung der IHC Auswertung und T-Test Bestimmung.

Antikörper (IHC)	anti-NeuN	anti-GFAP	anti-TH	anti- α -synuclein
Auswertung	manuell	manuell	automatisch	automatisch
\bar{X} (ho-Typ)	9,37E+08	2,62E+09	143,5	893,8
\bar{X} (wt-Typ)	1,71E+09	1,54E+09	155	0
T-Test (p)	< 0,0001	0,0043	n.s.	< 0,0001
Faktor	Ho < WT, F = 0,55	Ho > WT, F = 1,70	Ho < WT, F = 0,93	Ho > WT, 893,80

Der Parkinson-spezifische Marker NeuN wird für die Detektion von Neuronen eingesetzt. Der ho-Typ zeigt eine 45% verminderte Anzahl an Neuronen und wird mit der Parkinson-Krankheit assoziiert. Das GFAP-Protein ist ein spezifischer Marker für Immunzellen, und die Erhöhung des Proteins deutet auf eine akute Infektion hin und wird mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. Der ho-Typ zeigt eine 70%ige Steigerung des GFAP-Proteins in den Mausgehirngewebeschnitten. TH ist ein Enzym, das aktiv an der Biosynthese von Dopamin beteiligt ist, und die verminderte Produktion steht im direkten Zusammenhang mit der Pathogenese der Parkinson-Krankheit. Für den ho-Typ konnte eine 7%ige Dopamin Verminderung nachgewiesen werden. Die Expression des α -Synuclein-Proteins wird mit der Parkinson-Krankheit assoziiert. Für den ho-Typ war das α -Synuclein-Protein um die Zahl 893,80 größer als der wt-Typ. Zur statistischen Absicherung wurden die T-Tests für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper ermittelt. Für die Biomarker NeuN und α -Synuclein wurde ein T-Test $< 0,0001$ berechnet was bedeutet, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten der Gruppe des ho-Typs und wt-Typs ermittelt werden konnte. Der Biomarker GFAP zeigt einen T-Test von 0,0043 und verdeutlicht einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen.

Für den Biomarker TH konnte ein nicht signifikanter T-Test ($n.s \geq 0,05$) berechnet werden, was bedeutet, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten der Gruppen ermittelt werden konnte. Die berechneten T-Tests der kommerziellen IHC-Färbung wurden in weiteren Untersuchungen zur Validierung der neuartigen MeCAT-modifizierten Antikörper in einer direkten immunologischen Detektionsmethode, mittels LA-ICP-MS herangezogen.

3.7.4 LA-ICP-MS Detektion eines 8-fach Multiplex-Ansatz mit Parkinson-spezifischen Antikörpern

Die Untersuchung von Morbus Parkinson wurde an transgen Mausmodellen (ho-Typ) im direkten Vergleich zu nicht modifizierten Mausmodellen mit Hilfe der LA-ICP-MS durchgeführt. Zur Untersuchung der 8-fach Multiplex-Ansätze wurden folgende vier Parkinson-spezifischen Antikörper mit unterschiedlichen, charakteristischen MeCAT-modifiziert; anti- α -Synuclein(204)-Antikörper mit MeCAT(^{153}Eu), anti-GFAP-Antikörper mit MeCAT(^{165}Ho), anti-NeuN-Antikörper MeCAT(^{141}Pr) und anti-TH-Antikörper MeCAT(^{159}Tb). Zur Detektion von erhöhter Phosphorylierung von Proteinen wurde ein anti-Phosphoserin-Antikörper mit MeCAT(^{169}Tm) modifiziert. Um die Verteilung von unterschiedlichen Haushaltsproteinen in Gewebeschnitten zu untersuchen wurden folgende Antikörper; anti-Actin-Antikörper mit MeCAT(^{141}Nd), anti-GAPDH-Antikörper mit MeCAT(^{166}Er), anti-OxcT1-Antikörper mit MeCAT(^{175}Lu) modifiziert und zusätzlich eingesetzt, wie bereits erläutert (siehe Abschnitt 3.7). Die Haushaltsproteine konnten nicht als geeignete interne Standards verwendet werden. Eine detaillierte Auswertung zu den Haushaltproteinen ist in Kapitel 3.7.2.1 beschrieben. Als geeigneter interner Standard wurde eine homogene Indium-Bedruckung auf einer Gelatinebeschichtung eingesetzt (siehe Kapitel 3.7.2.2).

Die vier Parkinson-spezifischen Antikörper wurden ohne Modifikation einzeln in der IHC-Färbung, sowie mit MeCAT-Modifikation einzeln und im Multiplex-Ansatz für die LA-ICP-MS Analyse eingesetzt. Dies erlaubte einen direkten Vergleich zwischen der konventionellen IHC-Färbung und der neuen Methode für die Gruppe der Parkinson-spezifischen Antikörper. Dafür wurden die farbkodierten Intensitätsprofile, sowie die Indium-Normierung der Signalintensitäten (siehe Kapitel 3.4.1.3) aus den detektierten LA-ICP-MS Rohdaten erzeugt.

Exemplarisch für den großen Datensatz wurden in diesem Abschnitt die Intensitätsprofile mit der Probennummer 848 ho-Typ (Linie 62) und 267 wt-Typ, als 8-fach Multiplex-Ansatz mit einer Auflösung von 130 μm und 35 μm , detailliert betrachtet (siehe Abbildung 50, Abbildung 52). Die Abbildung 50 und die Abbildung 51 zeigen die normierten 2D Intensitätsprofile des ho- und wt- Typs, im direkten Vergleich zu den IHC-Färbungen der vier Parkinson-spezifischen Antikörper.

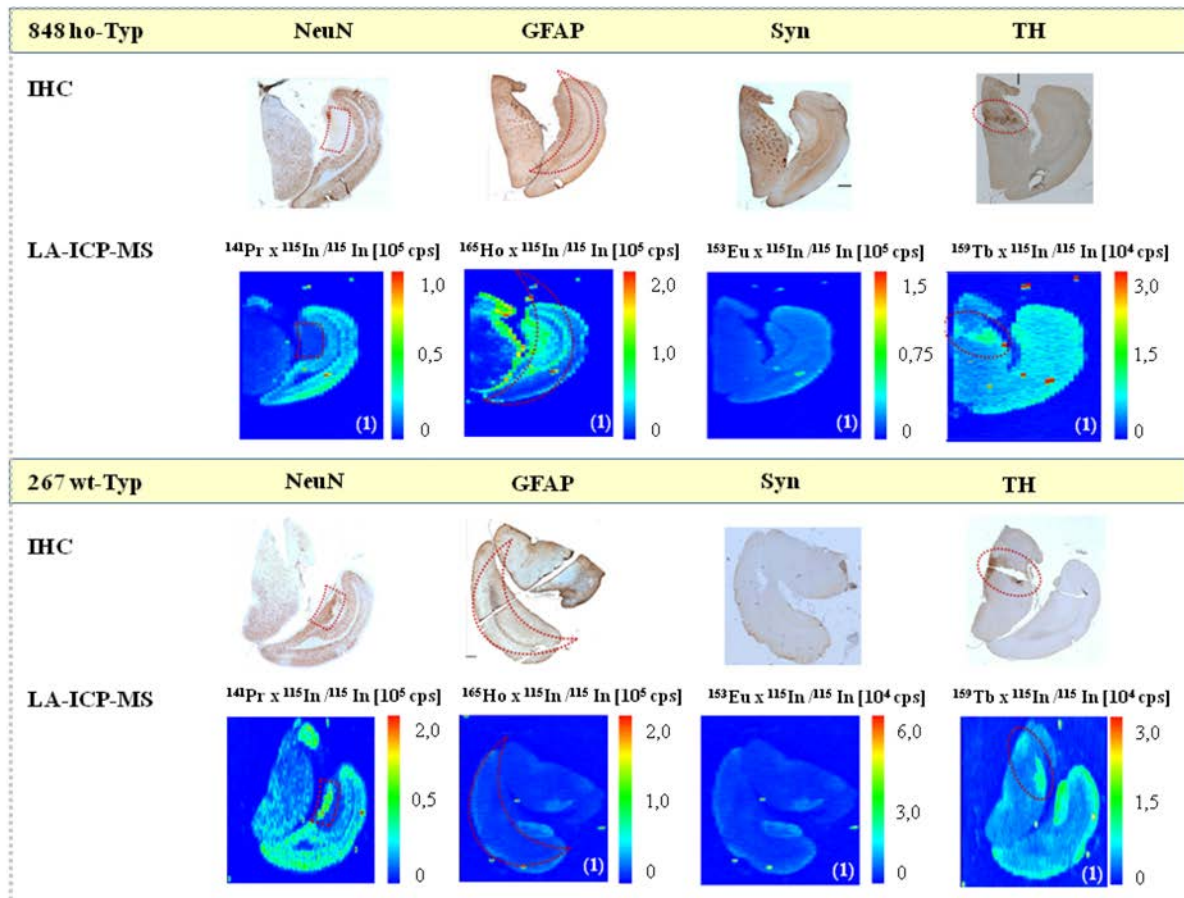


Abbildung 50 Zeigt Intensitätsprofile der vier Parkinson-spezifischen Biomarker in einem 8-fach Multiplex-Ansatz mit der Probennummer 848ho und 267wt. (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-Antikörper (AK) MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein (Syn)-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Eine detaillierte Auswertung zu den Haushaltproteine (5) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (6) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd); (7) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu); (8) anti-Phosphoserin-AK MeCAT(^{169}Tm) ist in Kapitel 3.7.2.1 beschrieben. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 150 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 130 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

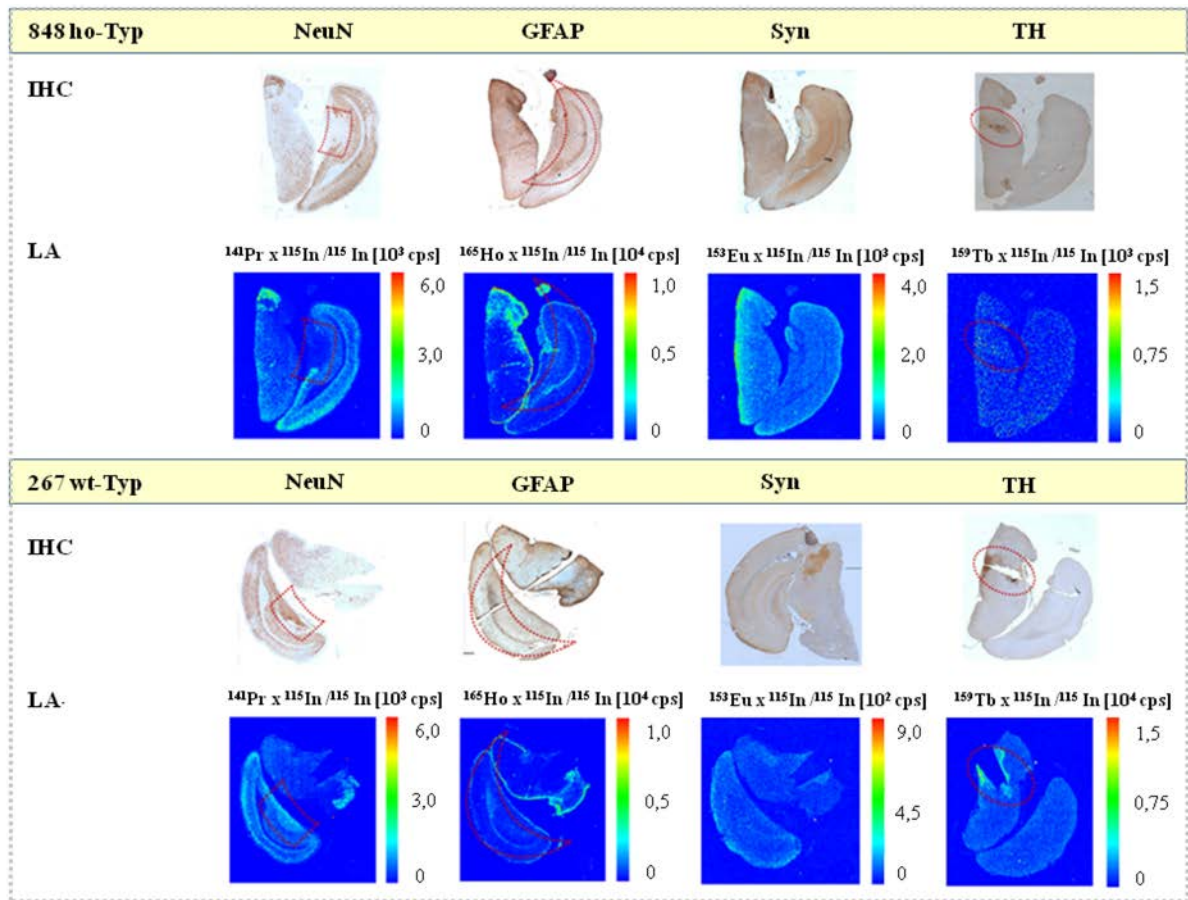


Abbildung 51 Zeigt Intensitätsprofile der vier Parkinson-spezifischen Biomarker in einem 8-fach Multiplex-Ansatz mit der Probennummer 848 ho und 267 wt. (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-Antikörper (AK) MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein (Syn)-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Eine detaillierte Auswertung zu den Haushaltproteine (5) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (6) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd); (7) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu); (8) anti-Phosphoserin-AK MeCAT(^{169}Tm) ist in Kapitel 3.7.2.1 beschrieben. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Im ho-Typ konnte das Fehlen des NeuN-Proteins in einem kleinen rot markierten Bereich detektiert werden (siehe Abbildung 51). Für GFAP konnte in beiden Typen eine sichelförmige Ansammlung des GFAP-Proteins beobachtet werden.

Allerdings sind die Signalintensitäten der Sichelform im ho-Typ signifikant höher. Das α -Synuclein-Protein zeigt eine relativ homogene Proteinverteilung. Für den ho-Typ konnte eine höhere Signalintensität für das α -Synuclein-Protein detektiert werden. Im wt-Typ und ho-Typ wurde für das TH-Protein eine kleine Proteinansammlung beobachtet. Die Proteinansammlung zeigt im wt-Typ etwas höhere Signalintensitäten, als in dem ho-Typ. Zusammenfassend konnte im direkten Vergleich zwischen den normierten Intensitätsprofilen

beider Detektionsauflösungen und den kommerziellen IHC-Färbungen, identische Ergebnisse für die vier Biomarker ermittelt werden (siehe Abbildung 50-51).

Zur Untersuchung einer erhöhten Phosphorylierung von Biomarkern im Mausgehirngewebeschnitt zur Charakterisierung von Morbus Parkinson wurde ein anti-Phosphoserin-Antikörper mit MeCAT(^{169}Tm) in dem 8-fach Multiplex-Ansatz zusätzlich eingesetzt und auf den internen Standard Indium normiert (siehe Abbildung 52). Um den Einfluss der genetischen Veränderung des Homotyp Maus (ho) zu untersuchen wurde im direkten Vergleich der unbehandelten Wildtyp Maus (wt) als Referenz detektiert.

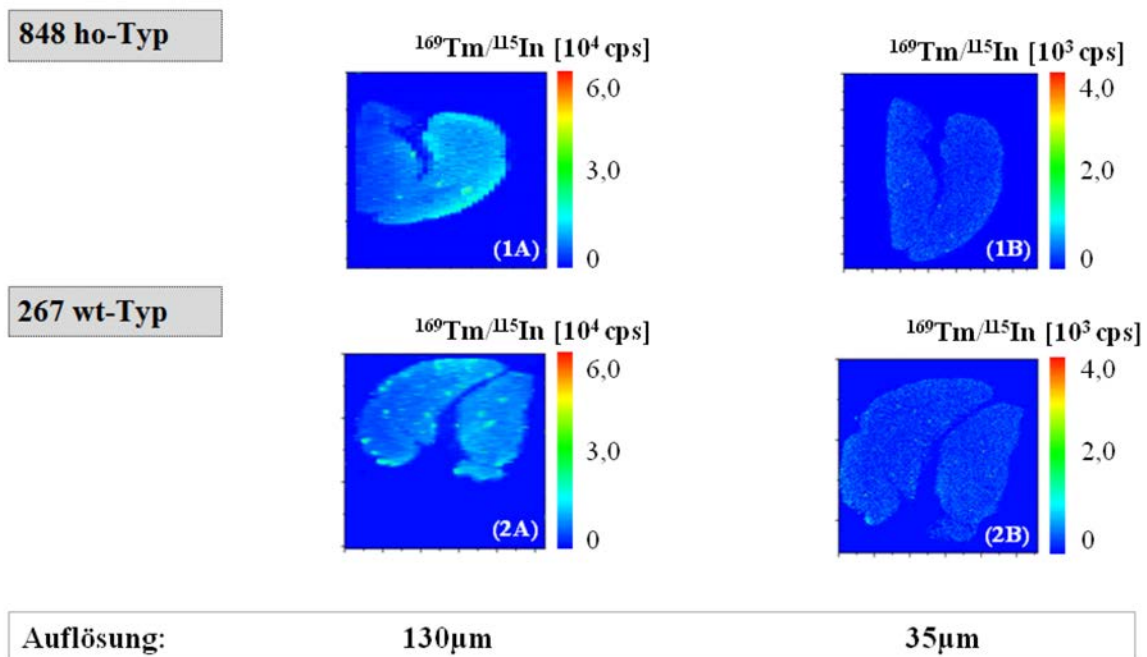


Abbildung 52 Zeigt die Indium-normierten Intensitätsprofile des anti-Phosphoserin-AK MeCAT(^{169}Tm) in einem 8-fach Multiplex-Ansatz mit der Probennummer 848ho und 267wt. Der Gewebeschnitt (5 x 4,5 mm) wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 130µm und 35 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 µm s⁻¹ und 50 µm s⁻¹ und einer Auflösung von 135 µm und 35 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Es konnte mittels LA-ICP-MS keine lokal erhöhte Protein Phosphorylierung detektiert werden. Das Indium-normierte Tm-Intensitätsprofil zeigt eine homogene Verteilung des Phosphoserins (siehe Abbildung 52). Für den anti-Phosphoserin-AK erfolgte keine statistische Absicherung, da keine erhöhte Protein Phosphorylierung detektiert werden konnte.

Allerdings konnte aufgrund der hervorragenden Kontrastierung der spezifischen Proteinmerkmale der Biomarker (siehe Abbildung 44-47), eine statistische Absicherung

durchgeführt werden. Zusätzlich wurden für die jeweils zwei Peakflächen der Singleplex- und Multiplex-Ansätze die Standardabweichungen und die relativen Standardabweichungen berechnet (siehe Abbildung 53, siehe Anhang: Tabelle 44-47). Es konnten relative Standardabweichungen von 1% bis 10% ermittelt werden. Die sehr guten relativen Standardabweichungen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der jeweiligen zwei Peakflächen der Singleplex und Multiplex-Ansätzen.

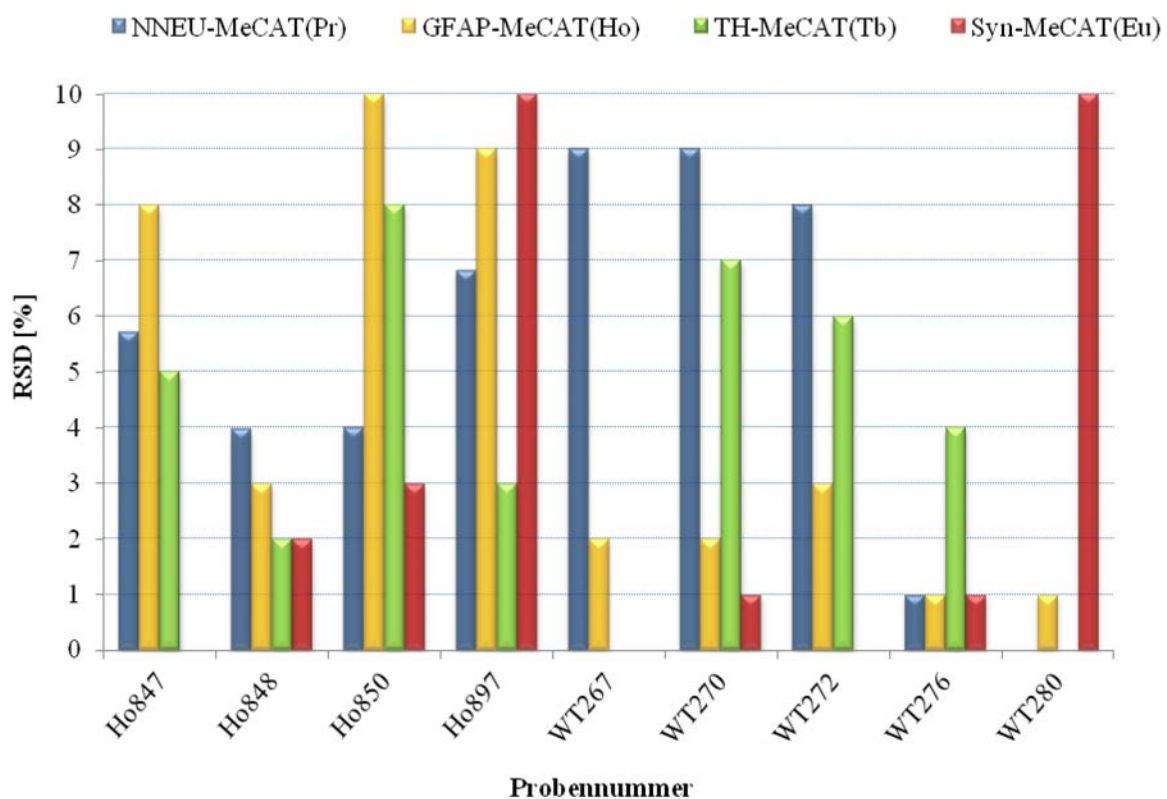


Abbildung 53 Zusammenfassung der berechneten relativen Standardabweichungen aus den jeweiligen zwei Peakflächen der Singleplex und Multiplex-Ansätze.

Zur detaillierten Datenanalyse wurden für die zwei Gruppen ho- und wt- Typ der jeweiligen Biomarker T-Tests zur statistischen Absicherung durchgeführt.

Für die Auswertung wurde eine Statistik-Software GraphPad Prism mit folgenden Einstellungen; zweiseitige Verteilung, zwei Stichproben mit gleicher Varianz, eingesetzt. Der T-Test dient zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Mittelwerten der Peakflächen der ho- und wt-Typ Mausgehirngewebeschnitte. Ergebnisse der statistischen Absicherung für die 164 Mausgehirngewebeschnitte sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 Zusammenfassung der LA-ICP-MS Auswertung mit einer Auflösung von 130 µm sowie der T-Test Berechnung für die vier Biomarker.

Antikörper (LA)	anti-NeuN	anti-GFAP	anti-TH	anti- α -synuclein
Laserspotgröße	130µm, 35µm	130µm, 35µm	130µm, 35µm	130µm, 35µm
\bar{X} (ho-Typ)	4,96E+06	1,42E+06	3,63E+05	5,54E+06
\bar{X} (wt-Typ)	9,04E+06	9,02E+05	3,84E+05	5,81E+04
TTES (p)	< 0,0001	< 0,0001	0,0043	< 0,0001
Faktor	Ho < WT, F = 0,55	Ho > WT, F = 1,57	Ho < WT, F = 0,95	Ho > WT, F = 95,33

Der ho-Typ zeigt eine 55% verminderte Anzahl an Neuronen. Die Erhöhung des GFAP-Proteins weist auf eine akute Infektion hin, und im ho-Typ konnte eine 57% Steigerung des GFAP-Proteins detektiert werden. Für den ho-Typ konnte eine 5% Dopamin Verminderung detektiert werden. Im ho-Typ war das α -Synuclein-Protein um den Faktor 95,33 größer, als der wt-Typ. Für die statistische Absicherung wurden die T-Tests für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper ermittelt. Die Biomarker NeuN, GFAP und α -Synuclein konnten mit einem T-Test von < 0,0001 berechnet werden. Das bedeutet, es konnte ein sehr signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten der Gruppe des ho-Typs und wt-Typs ermittelt werden. Für den Biomarker TH konnte ein T-Test von 0,0043 berechnet werden. Die statistische Absicherung der LA-ICP-MS Detektion wurde für eine Detektionsauflösung von 130 µm erfolgreich durchgeführt. Für die Detektionen mit einer Auflösung von 35 µm wurden nur 12 Gewebeschnitte detektiert, so dass eine statistische Auswertung nur bezogen auf die höhere Auflösung nicht möglich war.

3.7.5 LA-ICP-MS Detektion vs. IHC-Färbung

Die Indium-normierten Intensitätsprofile für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper stimmen im Vergleich mit den IHC gefärbten Mausgehirngewebeschnitten recht gut überein. Die Übereinstimmung konnte sowohl für die Singleplex-Ansätze, als auch für die Multiplex-Ansätze, mit der Auflösung von 130 μm und 35 μm nachgewiesen werden. Für eine detaillierte Auswertung wurden die T-Tests der IHC und der LA-ICP-MS Daten für die zwei Gruppen ho- und wt- Typ Mausgehirngewebeschnitte der jeweiligen vier parkinson-spezifischen Antikörper ermittelt. Für die IHC-Färbung wurden die spezifischen, schwarz gefärbten Zellen der Gewebeschnitte für die Proteine NeuN und GFAP manuell ausgezählt (siehe Anhang: Tabelle 38). Während für die Proteine TH und α -Synuclein die Bereiche automatisch durch Integration der Schwarzfärbung bestimmt wurden (siehe Anhang: Tabelle 39). Für die LA-ICP-MS wurden die Peakflächen der spezifischen Bereiche aus den normierten Intensitätsprofilen für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper berechnet (siehe Anhang: Tabelle 40-47).

Tabelle 14 Zusammenfassung der T-Test Bestimmung im direkten Vergleich zwischen der IHC und der LA-ICP-MS Detektion.

	IHC-Färbung	\bar{x} (Splex & Mplex) [counts]
Antikörper	anti-NeuN	anti- NeuN-MeCAT(Pr/In)
ho-Typ	9,37E+08	4,96E+06
wt-Typ	1,71E+09	9,04E+06
TTES (p)	< 0,0001	< 0,0001
Faktor	ho < wt, F = 0,55	ho < wt, F = 0,55
Antikörper	anti-GFAP	anti-GFAP-MeCAT(Ho/In)
ho-Typ	2,62E+09	1,42E+06
wt-Typ	1,54E+09	9,02E+05
TTES (p)	0,0043	< 0,0001
Faktor	ho > wt, F = 1,70	ho > wt, F = 1,57
Antikörper	anti-TH	anti.TH-MeCAT(Tb/In)
ho-Typ	143,5	3,63E+05
wt-Typ	155	3,84E+05
TTES (p)	n.s.	0,0043
Faktor	ho < wt, F = 0,93	ho < wt, F = 0,95
Antikörper	anti- α -synuclein-MeCAT(Eu/In)	anti- α -synuclein-MeCAT(Eu/In)
ho-Typ	893,80	5,54E+06
wt-Typ	0	5,81E+04
TTES (p)	< 0,0001	< 0,0001
Faktor	ho > wt, 893,80	ho > wt, F = 95,33

Die manuell und automatisch ermittelte Anzahl der schwarz gefärbten Zellen der IHC-Färbung, sowie die berechneten Peakflächen der LA-ICP-MS wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism und folgenden Einstellungen; zweiseitige Verteilung, zwei Stichproben mit gleicher Varianz für die T-Test Bestimmung herangezogen. Die Ermittlung der T-Tests ermöglicht einen direkten Vergleich zwischen der konventionellen IHC-Färbung und der neuen LA-ICP-MS Methode für die Gruppe der Parkinson-spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 14).

Für die IHC und LA-ICP-MS Detektion des Biomarkers NeuN konnten identische Ergebnisse erzielt werden. Die Berechnung des T-Test lieferte einen Wert der $< 0,0001$ ist, was bedeutet es konnte ein sehr signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten der Gruppen ermittelt werden. Beide Detektionsmethoden zeigten eine 55%ige Verringerung der Neuronen (NeuN) für den ho-Typ. Der Biomarker GFAP zeigte für die IHC-Färbung einen Wert für den T-Test von 0,0043. Während die LA-ICP-MS Detektion einen besseren Wert für den T-Test $< 0,0001$ mit einer höheren Signifikanz zeigt. Für die IHC-Färbung wurde eine 70%ige und für die LA-ICP-MS eine 57%ige Zunahme von Immunozellen (GFAP) für den ho-Typ detektiert. Die IHC-Färbung detektierte für GFAP eine 13% höhere Zunahme der Immunozellen im ho-Typ als die LA-ICP-MS Detektion. Dieser Unterschied resultiert eventuell aus der automatischen Auswertung der IHC gefärbten Gewebeschnitte. Für die LA-ICP-MS Detektion konnte eine geringere Zunahme der Immunozellen, mit einer besseren Signifikanz detektiert werden. Die IHC Detektion zeigte für den Biomarker TH einen nicht signifikanten Wert im T-Test ($n.s \geq 0,05$), was bedeutet es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten des ho-Typs und wt-Typs ermittelt werden. Während die LA-ICP-MS Detektion einen Wert für den T-Test von 0,0043 lieferte. Die IHC-Färbung zeigte eine 7%ige und die LA-ICP-MS eine 5%ige Verminderung von Dopamin (TH) für den ho-Typ. Für die beiden Detektionsmethoden konnte nur ein geringer Unterschied in der Verminderung von Dopamin beobachtet werden. Der T-Test zur LA-ICP-MS Detektion für das TH-Protein ergab eine höhere Signifikanz. Die IHC und LA-ICP-MS Detektion des Biomarkers α -Synuclein zeigt identische Wert für den T-Tests von $< 0,0001$. Für die IHC Detektion des ho-Typs war das α -Synuclein-Protein um die Zahl 893,80 größer als der wt-Typ. Die LA-ICP MS-Detektion ergab für den ho-Typ, dass das α -Synuclein-Protein um den Faktor 95,33 größer ist als im wt-Typ. Es konnte für den Biomarker ein Faktor bestimmt werden, da die LA-ICP-MS Detektion eine hohe

Empfindlichkeit aufweist und der Biomarker α -Synuclein auch im wt-Typ mit einer geringen Intensität detektiert werden konnte. Während die IHC-Färbung das α -Synuclein-Protein im wt-Typ Mausgehirngewebeschnitt nicht nachweisen konnte.

Die Kombination von MeCAT-modifizierten Parkinson-spezifischen Antikörpern mit der LA-ICP-MS Detektion zur Analyse von Biomarkern, erzielte die gleichen visuellen Ergebnisse, sowie teilweise bessere T-Tests mit einer höheren Signifikanz, als die kommerzielle IHC-Färbung. Die LA-ICP-MS Detektion zeigt eine höhere Toleranz, bzw. einen großen dynamischen Bereich für den Antikörper Nachweis und der biologischen Varianz, im Vergleich zur IHC-Färbung. Zur Detektion von Gewebe-Strukturinformationen lieferte die IHC Färbung wesentlich bessere Ergebnisse, aufgrund der höheren Auflösung des Lichtmikroskops. Für die LA-ICP-MS Detektion wurde eine Auflösung von 35 μm verwendet.

Derzeit kann mit dem von uns verwendeten Lasersystem eine maximale Auflösung von 5 μm erzielt werden. Um diese hohe Auflösung auch praktisch zu realisieren, müssen neue nachweisstärkere Markierungsreagenzien entwickelt werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die LA-ICP-MS für die Anwendung in der medizinischen Diagnostik weiter entwickelt. Dafür wurde zunächst eine neue Antikörper Metall-Markierungsstrategie mit dem Reagenz MeCAT ausgearbeitet, um die hochspezifische Antikörper-Antigen Reaktion, über die Metall-MeCAT-Markierung von Antikörpern, via LA-ICP-MS nutzbar zu machen. Die Verwendung von unterschiedlichen MeCAT-markierten spezifischen Antikörpern, in Kombination mit der LA-ICP-MS, ermöglichte den parallelen Nachweis von verschiedenen Antigenen in einer einzigen Analyse, im sogenannten Multiplexverfahren. Diese neue Methodik ermöglicht den Einsatz der LA-ICP-MS Analyse im medizinischen diagnostischen Bereich, wie der IHC-Färbung für die Früherkennung, bzw. Behandlung von Krebs, oder zur Entwicklung von Medikamenten. Hingegen können in kommerziellen immunologischen Nachweisverfahren nur wenige Analyte simultan untersucht werden.

Es war notwendig, dass die Antikörpermarkierung unter physiologischen Bedingungen erfolgte, um die Selektivität und Bindungsstärke der modifizierten Antikörper nicht zu beeinträchtigen. Die modifizierten Antikörper konnten für die konventionelle IHC-Färbung eingesetzt werden und lieferten identische Ergebnisse, wie die unbehandelten Antikörper. Der Einsatz von unterschiedlich, lanthanidbeladenen MeCAT-Reagenzien für die Antikörpermarkierung, lieferte bei der Metallquantifizierung via ICP-MS von Lösungen, annähernd gleiche Ergebnisse, mit sehr guten RSD-Werten. Aufgrund der hohen Signalintensitäten, niedrigen SNR und Nachweisgrenzen im unteren fmol Bereich [55], konnte eine Anwendung für biologische Proben im medizinischen Bereich durchgeführt werden.

Um die neue Markierungsstrategie mit der LA-ICP-MS Detektion für die klinische Diagnostik nutzbar zu machen, war es notwendig, eine zuverlässige interne Standardisierung und Kalibrierung zu etablieren, da sich bei der langen Meßdauer von Gewebeschnitten von > 8 h instrumentelle Drifteffekte zeigten.

Dies führte zur Entwicklung einer neuen Standardisierungstechnik, basierend auf Lanthanid-versetzten Tinten, die mit einem konventionellen Tintenstrahldrucker auf NC-Membranen gedruckt wurden. Durch die Anwendung des gedruckten internen Standards konnten Schwankungen der Probensignale in konventionellen Langzeitdetektionen von 18% auf 1-2% signifikant reduziert werden. Für den gedruckten Kalibrierstandard konnten folgende analytischen Kenngrößen, wie ein Bestimmtheitsmaß von > 0,999, die NWG von $\geq 3,6$ fmol

und die relativen Verfahrensstandardabweichungen von 1% ermittelt werden. Die Evaluierung der gedruckten Standards, mittels ICP-MS Analyse von Lösungen, lieferte identische Ergebnisse.

Im Rahmen von *Proof-of-Principle* Experimenten wurde die neue Standardisierungstechnik in direktem und indirekten Ansatz erprobt. Der direkte Ansatz ist repräsentativ für die Detektion von Metallen in Proteinen auf Blot Membranen, Mikroarrays oder in Gewebeschnitten. Während der indirekte Ansatz für alle Arten von Immunoassays steht. Für den direkten Ansatz wurden drei Standardproteine herangezogen und mit MeCAT modifiziert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Metallgehalt pro Proteinbande via LA-ICP-MS quantifiziert. Parallel erfolgte die Validierung des Metallgehalts über die ICP-MS Analyse von Lösungen. Im Vergleich der beiden Quantifizierungskonzepte konnte eine gute Übereinstimmung erzielt werden. Für ein Protein mit einer einzelnen MeCAT-Modifikation und einem angenommenen Molekulargewicht von 50 kDa konnte eine absolute Nachweisgrenze von 0,2 ng bestimmt werden. In dem indirekten Ansatz wurden MeCAT(¹⁴¹Pr)-modifizierte Antikörper-Konjugate auf einer NC-Membran quantifiziert. Der Metallgehalt pro Konjugat wurde mittels LA-ICP-MS, unter Verwendung der gedruckten Standardisierung quantifiziert und via ICP-MS Analyse von Lösungen evaluiert. Mit Hilfe der LA-ICP-MS konnten bei der Quantifizierung bessere RSD, als mit der ICP-MS erzielt werden. Die berechneten statistischen Daten, sowie die niedrigen Nachweisgrenzen der neuen Drucktechnik zur Kalibrierung, sind sehr vielversprechend für die direkte Metallquantifizierung von Western Blot Membranen und Immunoassays via LA-ICP-MS. Nach erfolgreicher Validierung der Antikörpermarkierung und der gedruckten Standardisierung, wurde diese Strategie für die IHC-Färbung im klinisch-medizinischen Bereich angewendet.

In Vorversuchen wurde keine Abhängigkeit zwischen der Signalintensität des modifizierten Antikörper-Konjugats und der Gewebeschichtdicke ermittelt. Daher konnte ein Eindringen des MeCAT-markierten Antikörpers in FFPE konservierte Gewebeproben ausgeschlossen werden. Aufgrund der oberflächlichen Antikörperbindung eignet sich der gedruckte interne Standard zur Korrektur von Matrix-Effekten, Gerätedrifts, wie z. B. Laserschwankungen hervorragend. Eine weitere Korrektur der Gewebeschichtdicke mittels Iodierung ist nicht notwendig, vor allem da deren Anwendung auf niedrige Auflösungen beschränkt ist.

Desweiteren konnte der gedruckte interne Standard zur Verbesserung der Bildqualität der 2D Intensitätsprofile in einem 8-fach Multiplex-Ansatz an einem FFPE Test-TMA-Gewebeschnitten erfolgreich angewendet werden. Dafür wurden eingesetzt: vier klinische Pprostatakarzinom-spezifische Antikörper, ein potentieller Tumormarker, ein Antikörper für eine absolute negativ-Kontrolle aller Proben und zwei Antikörper gerichtet gegen Haushaltsproteine. Zur Validierung wurde für die vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper kommerzielle IHC-Färbungen unter denselben Bedingungen wie für die LA-ICP-MS durchgeführt.

Die im Rahmen der IHC-Färbung auftretenden falsch-positiven Ergebnisse für Normalgewebe konnten aufgrund des größeren dynamischen Bereichs und der hohen Empfindlichkeit der LA-ICP-MS von positiven Gewebeproben unterschieden werden. Die Ergebnisse der LA-ICP-MS Detektion zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den IHC Ergebnissen aus der Literatur. Der eingesetzte potentielle Tumormarker für die Erkennung von Prostatakarzinom zeigte nur einen geringen positiven Status und kann als Biomarker ausgeschlossen werden. Mit dem Antikörper für die negativ-Kontrolle konnte im Normalgewebe und in den Biopsieproben erwartungsgemäß nur ein Untergrundsignal detektiert werden. Für die beiden Haushaltsproteine konnte aufgrund der sehr hohen relativen Standardabweichungen, kein direkter Zusammenhang zwischen der Protein-Konzentration bzw. -verteilung ermittelt werden.

Nach erfolgreicher Anwendung des gedruckten internen Standards bei TMA-Gewebeschnitten konnte eine weitere Anwendung an Mausgewebeschnitt zur Identifizierung von Biomarkern für die Krankheit Morbus Parkinson, erfolgreich gezeigt werden. Dafür wurden genetische-modifizierte Homotyp Mausgehirngewebeschnitte und unbehandelte Wildtyp Mausgehirngewebeschnitte als Referenz untersucht. Insgesamt wurden in dem 8-fach Multiplex-Ansätze 176 Mausgewebeschnitte in Doppelbestimmung mit gedruckter Standardisierung detektiert. Zur homogenen Aufbringung der Tinte auf hydrophoben Adhäsions-Objektträgern wurde ein Verfahren entwickelt, indem Gelatine zur Haftvermittlung eingesetzt wurde. Für die Detektion wurden vier erprobte Parkinson-spezifische Antikörper, ein Antikörper zur Detektion von erhöhter Phosphorylierung von Proteinen und drei Haushaltsproteine mit unterschiedlich beladenem MeCAT-markiert und eingesetzt.

Zur Validierung der MeCAT-modifizierten Antikörper wurden für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper konventionelle IHC-Färbungen etablierten Bedingungen durchgeführt. Die LA-ICP-MS Ergebnisse der Singleplex-und Multiplex-Ansätze zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den IHC gefärbten Mausgehirngewebeschnitten.

Zur statistischen Absicherung wurden für beide Detektionskonzepte die jeweiligen T-Tests für die Parkinson-spezifischen Antikörper ermittelt. Die LA-ICP-MS Detektion zur Analyse von Parkinson-spezifischen Biomarkern erzielte identische und teilweise bessere T-Tests, mit einer höheren Signifikanz, als die kommerzielle IHC-Färbung. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der LA-ICP-MS Detektion war es möglich, den Parkinson-spezifischen α -Synuclein Biomarker im unbehandelten Wildtyp Maus, mit einer geringen Signalintensität zu detektieren, im Gegensatz zur weniger sensitiven IHC-Färbung.

Zusammenfassend konnte die Markierungsstrategie erfolgreich optimiert und für Gewebeproben in zwei unterschiedlichen 8-fach Multiplex-Ansätzen erprobt werden. Ein wesentlicher Vorteil der LA-ICP-MS Detektion, in Kombination mit MeCAT-modifizierten Antikörpern, ist der simultane Nachweis von mehreren Biomarkern gleichzeitig, während mit konventionellen Nachweismethoden nur ein Parameter pro Gewebeschnitt detektiert werden kann. Desweiteren konnte eine neue Standardisierungstechnik erfolgreich entwickelt und validiert werden. Die Anwendung der internen Standardisierung führte zur Verbesserung der Bildqualität von 2D Intensitätsprofilen durch die Korrektur von Signalschwankungen. Mit Hilfe der Kalibrierungstechnik konnte der Metallgehalt von Proteinen auf Blot Membranen und Immunoassays quantifiziert werden. Ein entscheidender Vorteil dieser Standardisierungstechnik ist die Berücksichtigung der aufwendigen biochemischen Arbeitsschritte von komplexen biologischen Proben, so dass die Aufbringung der gedruckten Standards erst nach der Probenvorbehandlung erfolgt. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Standardisierungstechnik ist der Einsatz von beliebigen Metallen, so dass eine Anpassung der Ionisierungsenergie und Atomgewicht des internen Standards an die jeweiligen Analyten einfach angepasst werden kann. Somit konnte ein annähernd gleiches Verhalten während des Laserabtrags und dem Transport zum ICP-MS gewährleistet werden. Die interne Standardisierung kompensiert Schwankungen während des Laserabtrages und Materialtransportes, sowie generelle instrumentelle Schwankungen, so dass die Bildqualität von 2D Intensitätsprofile verbessert bzw. die Detektion mit höheren Auflösungen und Analysenzeiten von mehr als 16 h ermöglicht. Die Anpassung der Kalibrierstandards an die Analytkonzentration und Auflösung

ist durch die Abstufung der Druckdichte einfach anwendbar. Anhand der statistischen Absicherung mittels T-Test Berechnung zeigt die LA-ICP-MS Detektion eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der biologischen Varianz im Vergleich zu IHC-Färbung.

Der Einsatz von Metall-markierten Antikörpern in Kombination mit der LA-ICP-MS zur Bildgebung von medizinischen Gewebeschnitten erweitert die konventionelle IHC-Färbung in Richtung neuer Multiplex-Analysen. Die hier erprobte Standardisierung reduziert in der LA-ICP-MS nicht nur Meßartefakte, sondern kann in der medizinischen Diagnostik zur allgemeinen Standardisierung verwendet werden und erlaubt so den Vergleich von Ergebnissen zwischen Kliniken. Bei Verwendung von Standardprotokollen lassen sich Immunoassays, wie sie hier vorgestellt werden, einfach kalibrieren und einem Farbton läßt sich so objektiv ein Intensitätswert zuordnen, der eine objektive Beurteilung eines Biomarkers erlaubt. Mit den hier vorgestellten neuen Methoden wagen wir einen ersten Schritt vorwärts in Richtung einer quantitativen Mikroskopie basierend auf der Bildgebung mittels LA-ICP-MS, auch wenn bis zum Erreichen dieses Ziels noch ein weiter Weg vor uns liegt.

5 Material und Methoden

In dieser Doktorarbeit soll im Rahmen eines Technologie-Transfer-Projektes des BMWi (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie) mit der Proteome Factory AG ein neues Metall-basierendes Markierungsverfahren von Antikörpern und deren Anwendung im medizinisch diagnostischen Bereich entwickelt und deren Detektion durch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma (ICP-MS) erprobt werden.

5.1 Detektion ICP-MS

Einmal pro Woche wurden die instrumentellen Parameter des ICP-MS mit flüssigen Standards mit einer Zyklonkammer (Glass Expansion, Melbourne, Australia) als Zerstäuber mit einer Flussrate von $1,0 \text{ L min}^{-1}$ optimiert. Es wurden die Gasflüsse, Einstellungen der Ionenlinsen und die HF-Leistung mit einer Tune-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Bremen), die 1 ng mL^{-1} Natrium, Indium, Uran enthält, im niedrigen Auflösungsmodus auf eine Empfindlichkeit von mindestens $1\,200\,000 \text{ cps}$ für In und $1\,800\,000 \text{ cps}$ für U und einem RSD Wert von $\leq 2\%$ optimiert. Zusätzlich wurden die Gasflüsse, die Plasmafackelposition und die Einstellungen der Ionenlinsen täglich optimiert.

Die Optimierung erfolgte auch vor der Kopplung mit dem Lasersystem für die LA-ICP-MS Analysen. Die Konen des Interface-Bereiches waren aus Nickel CertiPur® (Merck, Darmstadt, Deutschland). Der Aufbau des ICP-MS ist in Abschnitt Grundlagen 2.1.1 (siehe Abbildung 1) detailliert beschrieben und die Betriebsparameter in Tabelle 15.

5.1.1 ICP-MS Analyse von Lösungen

Für die ICP-MS Analyse von Lösungen wurde ein Zerstäubersystem mit einer peristaltischen Pumpe eingesetzt, um das Ansaugen der Probelösung mit gleichmäßigem Volumen an Probelösung zu gewährleisten. Das Prinzip der ICP-MS Analyse von Lösungen ist in Abschnitt Grundlagen 2.1.2.1 (siehe Abbildung 1) erklärt. Die ICP-MS Metallquantifizierung erfolgt über eine externe Kalibrierung. Als interner Standard wurde grundsätzlich Indium (Carl Roth, 1000 mg L^{-1}) eingesetzt. Praseodym (Carl Roth, 1000 mg L^{-1}) wurde nur als interner Standard eingesetzt wenn Indium als Analyt quantifiziert werden mußte.

5.1.1.1 Probenvorbereitung und Detektion des Markierungsgrades von Antikörpern

Für die Optimierung wurden die durchschnittlichen Markierungsgrade der MeCAT-markierten Antikörper in Lösung mit der ICP-MS bestimmt (siehe 3.2). Dafür wurden je 10 µL des modifizierten Antikörpers 1: 1000 verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mit 50 ng L⁻¹ Indium (Carl Roth, 1000 mg L⁻¹) als internem Standard, in einer 3,5%igen Salpetersäure (Rotipuran Roth, Karlsruhe). Analog wurde ein externer Kalibrierstandard im Stoffmengenkonzentrationsbereich von 100 pg L⁻¹ bis 1,0 µg L⁻¹ aus einem Multielementstandard (Alfa Aesar, 500 mg L⁻¹) hergestellt. Die Flüssigmessung wurde an einem Element XR (Thermo Finnigan, Bremen) ICP-MS mit jeweils 1 ml Standard, bzw. Probe durchgeführt. Kurz vor der Detektion wurden die Standards und Proben gevortext. Alle Standards und Proben wurden mittels Zerstäuber (Glass Expansion, Melbourne) bei 1 L Argon min⁻¹ eingesaugt und zerstäubt. Die Analysenparameter für die Elemente wurden mit Hilfe der Herstellersoftware ermittelt und eingestellt. Die konstanten Signalhöhen wurden integriert und die daraus resultierenden Flächen bezogen auf den internen Standard zur Quantifizierung verwendet. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden Messparameter (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15 Zusammenfassung der Messparameter für die ICP-MS Analyse von Lösungen.

ICP-MS Parameter	
Massenspektrometer	Element XR
Probeneintrag	MicroMist Zerstäuber w/ Twinnabar Zyklonen Sprühkammer
Sampler und Skimmer Konus	Nickel
RF Leistung [W]	1300
Scan Mode	E- & B-Scan
Nebulizer Gasflußrate [L min ⁻¹]	1,00
Auxiliary Gasflußrate [L min ⁻¹]	0,92
Plasmagas-Flußrate [L min ⁻¹]	16
Datengenerierung	
Isotope: Analyten	¹⁶⁵ Ho, ¹⁵³ Eu, ¹⁶⁹ Tm, ¹⁴¹ Pr, ¹⁷⁵ Lu, ¹¹⁵ In ¹⁵⁹ Tb, ¹⁶⁶ Er, ¹⁴² Nd, ¹⁶⁹ Tm, ¹⁷⁴ Yb, ¹²⁷ I
Interner Standard	¹¹⁵ In oder ¹⁴¹ Pr
Probe pro Peak	100
Massenfenster [%]	300
Runs /Passes	3/5
Integrationszeit [ms]	600
Messzeit [min]	1

5.1.1.2 Probenvorbereitung und Analyse von NC-Membranen

Proteinbanden auf den NC-Blotmembranen wurden mit Ponceau S reversibel angefärbt, ausgeschnitten und für die ICP-MS Detektion aufgelöst (siehe 3.2). Ebenfalls wurden Testmembranen separat mit einem Kalibrierstandard und einem internen Standard vollständig bedruckt (siehe 3.4). Der interne Standard (In) wurde an verschiedenen Stellen ausgeschnitten. Die 10 Quadrate des gedruckten Kalibrierstandards wurden ebenfalls ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen NC-Membranen wurden mit 50 µL einer 69%igen Salpetersäure (Rotipuran Roth, Karlsruhe) versetzt und für 30 min im Ultraschallbad (Transsonic T460/H) inkubiert. Die vollständig aufgelösten Membranproben wurden mit 3,5% Salpetersäure (Rotipuran Roth, Karlsruhe) verdünnt und mit 50 ng L⁻¹ In oder Pr als interner Standard versetzt wurde. Um Verdünnungseffekte durch die Probe auf den internen Standard zu minimieren, erfolgten Verdünnungen 1:100 für verflüssigte Membranproben. Analog wurden die Proben wie unter Abschnitt 5.1.1.1 detektiert.

5.1.2 Messung an der LA-ICP-MS

Die meisten Analysen in dieser Arbeit erfolgten mittels LA-ICP-MS. Es wurden biologische Proben, die zum Beispiel Proteine auf NC-Membranen oder Gewebeprobe auf Glasobjektträgern immobilisiert waren mittels LA-ICP-MS untersucht [68]. Dafür wurde ein kommerzielles Lasersystem (New Wave 213, ESI, Portland, USA) mit einem Strahlaufweiter und einer Laserspotgröße von 4 µm bis 250 µm mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS, Element XR, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gekoppelt und durch externe Triggerung synchronisiert. Das Triggersignal wurde vom Lasersystem zum ICP-MS gesendet (siehe Grundlagen 2.1.3). Vor jeder ICP-MS Kopplung mit dem Lasersystem wurden die ICP-MS Parameter sorgfältig optimiert (siehe Abschnitt 5.1).

Bevor die Probendetektion mit dem Lasersystem erfolgte, wurde das System auf eine maximale Ionenintensität von Barium durch Ablation eines Glasobjektträgers, unter Berücksichtigung der Oxid-Rate von ThO/ Th < 3% und einem RSD von Th \leq 5%, optimiert. Die Ablation erfolgte mit einer Laserspotgröße von 200 μm , einer Laserscangeschwindigkeit von 10 $\mu\text{m s}^{-1}$, einer Frequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von ca. 2 mJ (100%). Die NC-Membranen oder die Gewebeschnitte wurden auf einem Probenhalter fixiert und in die duale Ablationszelle eingeführt (siehe Grundlagen 2.1.3, Abbildung 1). Die Zelle wurde von Helium als Transportgas mit einer Flussrate von 1 L min^{-1} durchströmt.

Nach Fokussierung der jeweiligen Probe (NC-Membran, Gewebeschnitte) wird mit Hilfe des Lasers das Probenaerosol generiert. Dabei wird die Probe vollständig im *Differential Scanning Modus* (siehe Grundlagen 2.1.3, Abbildung 3A)) durch Linienscans, zeilenförmig abgetragen. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte mit optimierten Laserparametern in Anlehnung zu der Arbeit von Giesen *et al.* [28]. Dafür wurden die Laserspotgrößen proportional zur Laserscangeschwindigkeit variiert und eine Laserfrequenz von 20 Hz sowie eine Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%) verwendet. Um eine Probe vollständig abzutragen, werden mehrere Linienscans, die um 15-20 μm überlappen, gemessen (siehe Abbildung 3B). Das Probenaerosol wird mit Hilfe des Transportgases Helium zum ICP-MS geleitet. Zur Verdünnung des Aerosols wurde als Hilfgas Argon mit einer Flussrate von 0,8 L min^{-1} , vor dem Plasma, über ein T-Stück zugefügt und ins ICP-MS transportiert. Die Analyse erfolgte mit folgenden Messparametern (siehe Tabelle 16).

Die akquirierten LA-ICP-MS Daten der einzelnen Linienscans (siehe Abbildung 4) für das jeweilige Element wurden mit Hilfe eines Matlab Programms zusammengefasst und die Daten für die Auswertung in das Programm Microsoft Excel (Microsoft, Redmond WA, USA) und anschließend in das Programm Origin 8.1 (Originlab Corporation Northhampton, USA) exportiert. In Microsoft Excel wurden die Daten der einzelnen Probensignale durch die Normierung auf den internen Standard Indium standardisiert. Anschließend wurden die 2D Intensitätsprofile, oder auch sogenannte farbkodierte Oberflächenprofile, für jedes Element

mit dem Programm Origin erstellt, und zwar durch die Umrechnung der Scan-Zeit in einen Mikrometermaßstab (siehe Grundlagen 2.1.3, Abbildung 4).

Tabelle 16 Zusammenstellung der Messparameter für die LA-ICP-MS.

Laser Parameter	
Laser	New Wave 213 (ESI)
Wellenlänge [nm]	213
Laserenergie [mJ]	0.20 - 0.25
Laserspotgröße [μm]	25-200
Laserscangeschwindigkeit [$\mu\text{m s}^{-1}$]	25-200
Überlappung der Linienscans [μm]	20-30 μm
Laserfrequenz [Hz]	20
Detektionsmodus	<i>Differential Scanning Modus (Single line scan)</i>
ICP-MS Parameter	
Massenspektrometer	Element XR
Sampler und Skimmer Konus	Nickel
RF Leistung [W]	1150-1350
Scan Mode	E-Scan
Transportgas He [L min^{-1}]	1
Nebulizer Gasflußrate [L min^{-1}]	0,6-0,8
Auxiliary Gasflußrate [L min^{-1}]	0,8-1,0
Plasmagas-Flußrate [L min^{-1}]	15
Datengenerierung	
Isotope: Analyt	^{165}Ho , ^{153}Eu , ^{169}Tm , ^{141}Pr , ^{175}Lu , ^{159}Tb , ^{166}Er , ^{142}Nd , ^{169}Tm , ^{174}Yb
Interner Standard	^{115}In , ^{127}I , ^{141}Pr ,
Massenauflösung ($m/\Delta m$)	300
Probe pro Peak	100
Massenfenster [%]	5
Proben Integrationszeit [ms]	2
Totale Integrationszeit [ms]	10

5.2 Optimierung der Markierungsstrategie

5.2.1 Selektive Reduktion mit Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)

Zur Optimierung der selektiven Reduktion wurden verschiedene Puffer und TCEP-Konzentrationen an einem polyklonalen anti-Lysozym-Antikörper vom Kaninchen getestet (siehe Tabelle 17). Aus einer TCEP-Stammlösung (500 mM TCEP, 100 mM HCL) wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Tris-Puffer hergestellt (Tabelle 17) und die Antikörper-Konzentration (6,67 pmol/ μL , 666,67 pmol) konstant gehalten. Die Teilreduktion erfolgte in einem 50 kDa *Cut Off* Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra Centrifugal Devices).

Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 37 °C auf einem Schüttler (ThermoMixer, Eppendorf) bei einer Geschwindigkeit von 350 rpm. Die Konzentrationsverhältnisse von Antikörper zu Reduktionsmittel wurden variiert im molaren Verhältnis von 1:9 (AK:TCEP) bis zu einem deutlichen Überschuss von 1:1125.

Tabelle 17 Zusammensetzung der TCEP Verdünnungsreihen und getesteten Puffer.

Ansätze	n (AK) [nmol]	n (TCEP) [nmol]	Puffer	SDS-Gel [%]
Test_01	0,67	6,00-200,00	200 mM Tris	12
Test_02	0,67	6,00-400,00	20 mM Tris	12
Test_03	0,67	400	100 mM Phosphat	12
Test_04	0,67	6,00-750,00	20 mM Tris	12
Test_05	0,67	6,00-400,00	20 mM Tris	12

200 mM Tris : 200 mM Tris; 150 mM NaCl; 25 mM EDTA (pH 7,4)

20 mM Tris: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4)

100 mM Phosphat: 100 mM Phosphat; 2,5 mM EDTA (pH 7,2)

Die teilreduzierten Antikörper der fünf Ansätze (siehe Tabelle 17) wurden jeweils elektrophoretisch, mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (siehe Kapitel 5.6.2). Es wurden je 2 µg (13,33 pmol) des teilreduzierten Antikörpers pro Geltasche aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die Silberfärbung gemäß Herstellerangaben des Kits (FireSilver, Proteome Factory AG, Berlin), um den Grad der Reduktion der Antikörper zu beurteilen.

5.2.2 Metall-Markierung der Antikörper mit MeCAT

Für die MeCAT-Markierung darf die Antikörperlösung keine Proteinzusätze wie BSA oder Gelatine enthalten, da diese die Markierung stören und den Untergrund erhöhen. Bei einem zusätzlichen maximalen Proteinanteil wie BSA oder Gelatine von 1% ist eine Minimierung der Additive mit dem Pierce® Antibody Clean-up Kit (Thermo Scientific), gemäß der Herstellerangaben, erforderlich. Durch die Aufreinigung kann es zu Proteinverlusten von bis zu 50% kommen.

Die Antikörperlösungen wurden jeweils mit einem 600-fachen molaren TCEP-Überschuss für 30 min selektiv reduziert. Um die Inkubationszeit einzuhalten und eine vollständige Reduktion der Antikörper zu verhindern, erfolgte die Abtrennung des TCEP-Überschusses ausschließlich über ein 30 kDa Zentrifugenröhrchen. Um das optimale molare Verhältnis zwischen Antikörper und MeCAT-Reagenz zu ermitteln, wurde die Antikörperkonzentration

(6,67 pmol/ μ L, 666,67 pmol) konstant gehalten und die MeCAT-Konzentration variiert. Die Konzentrationsverhältnisse von Antikörper zu MeCAT lagen im molaren Bereich von 1:10 bis zu einem deutlichen Überschuss von 1:45. Die MeCAT-Modifikation erfolgte in einem 50 kDa *Cut Off* Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra Centrifugal Devices) mit einem 20 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4)).

Es wurden jeweils 100 μ L Antikörperlösung mit 300 μ L eines Tris Puffers in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 7500 xg, bis zum *hold-up* Volumen von ca. 50 μ L zentrifugiert, um Additive wie zum Beispiel Natriumazid (NaN_3) zu entfernen. Für die selektive Teilreduktion wurde zur Antikörperlösung 100 μ L einer TCEP-Lösung (molarer Überschuss von 1: 600 (AK: TCEP)) gegeben. Anschließend wurde das Gemisch kurz gevortext und für 30 min bei exakt 37°C inkubiert. Um die Teilreduktion durch Entfernung des TCEP-Überschusses zu beenden, wurden 300 μ L Tris Puffer zugeben und für 5 min zentrifugiert (wie oben). Zur Entfernung des Überschusses an TCEP wurde das Gemisch mit 300 μ L Tris Puffer versetzt und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wurde der teilreduzierte Antikörper in 100 μ L Tris Puffer aufgenommen und mit 5 μ L der jeweiligen MeCAT-Lösung (siehe Tabelle 18) versetzt und kurz gevortext. Die MeCAT-Verdünnungsreihe wurde nicht mit der Lösung C gemäß Hersteller Angaben des Kits (MeCAT, Proteome Factory AG, Berlin) hergestellt, sondern unter nicht denaturierenden Bedingungen mit einem 5 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5). Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C wurde die Markierung beendet und zwar durch die Zugabe von 300 μ L Tris Puffer und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 7500 xg. Zur Entfernung des MeCAT-Überschusses wurde das Gemisch erneut mit 300 μ L Tris Puffer versetzt und wiederholt zentrifugiert. Der modifizierte Antikörper wurde in 100 μ L Tris Puffer aufgenommen, kurz gevortext und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Abschnitt 5.6.1). Die Lagerung der modifizierten Antikörper erfolgte gemäß den Herstellerangaben des jeweiligen Antikörpers.

Tabelle 18 Zusammenfassung der getesteten MeCAT(^{166}Er) und MeCAT(^{146}Nd) Verdünnungsreihen.

Antikörper	n AK	n TCEP	n MeCAT(^{166}Er), (^{146}Nd)
	[nmol]	[nmol]	[nmol]
anti-Lysozym	0,67	400,00	6,67
anti-Lysozym	0,67	400,00	13,33
anti-Lysozym	0,67	400,00	30,00

Die besten Ergebnisse konnten mit dem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT erzielt werden. Dieser molare Überschuss an MeCAT entspricht den Herstellerangaben des MeCAT-Kits für Proteine (Proteome Factory, PM10001). Für die weitere Optimierung der Modifikation wurde ein 600-facher molarer Überschuss an TCEP und einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT eingesetzt.

Zur Entfernung des 20-fachen molaren MeCAT-Überschusses wurde eine Dialyseeinheit, Dialysekapsel und Zentrifugenröhrchen getestet und nach geringstem Antikörperverschleiss bewertet.

5.2.3 Aufreinigung der markierten Antikörper mittels Mini-Dialyseeinheit

Nach der Markierung von anti-Lysozym-Antikörper (3,33 pmol/μL, 166,67 pmol, siehe Abschnitt 5.2.2) mit MeCAT(¹⁶⁵Ho) erfolgte die Entfernung des Überschusses mittels Mini-Dialyseeinheit (10-100 μL, Thermo Scientific). Es wurden 50 μL des modifizierten Antikörper 4-mal für je 1 h gegen je 0,5 L Tris-Puffer (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4) dialysiert. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6.1).

5.2.4 Aufreinigung der markierten Antikörper mittels Dialysekapsel

Der MeCAT(¹⁶⁵Ho) markierte anti-Lysozym-Antikörper (3,33 pmol/μL, 166,67 pmol, siehe Abschnitt 5.2.2) wurde mit einer Dialysekapsel ((0,1 ml; Roth; H448.1) aufgereinigt. Dafür wurden 50 μL des Ansatzes in die Dialysekapsel pipettiert und mit einer Dialysemembrane (Spectra/Par7, Roth; H448.1) verschlossen. Die Dialyse erfolgte 4-mal für je 1 Stunde gegen je 0,5 L Tris-Puffer (20 mM Tris; 15 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4). Nach Entfernung des Reagenzüberschusses erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Abschnitt 5.6.1).

5.2.4.1 Aufreinigung der markierten Antikörper mittels Ultrafiltration

Es wurden zwei unterschiedliche Ultrafiltrationsröhrchen, das 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Nanosep Centrifugal Filters) und das 50 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra Centrifugal Devices), getestet.

Nach der MeCAT(¹⁶⁵Ho)-Markierung von anti-Lysozym-Antikörper (6,67 pmol/μL, 666,67 pmol, siehe Abschnitt 5.2.2) wurden bei Raumtemperatur 300 μL Tris Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4) zu dem Ansatz in das Ultrafiltrationsröhrchen gegeben und für 5 min bei 7500 xg zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des MeCAT-Überschusses wurde der Ansatz erneut mit 300 μL Tris Puffer versetzt und wiederholt zentrifugiert. Der modifizierte Antikörper wurde in 100 μL Tris Puffer aufgenommen, kurz gevortext und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Abschnitt 5.6.1).

5.2.4.2 Immunreaktion mit den Metall-markierten Antikörper auf NC-Membran für die LA-ICP-MS Detektion

Mit Hilfe der Immunreaktion wurden zunächst die unterschiedlich stark MeCAT-markierten anti-Lysozym-Antikörper (siehe Abschnitt 5.2.2, Tabelle 18) auf ihre spezifische Antikörper(MeCAT)-Antigen Bindung bzw. deren Signalintensität nach der Reaktion mit Hilfe der LA-ICP-MS Detektion (siehe Abschnitt 5.1.2) von Western Immunoblot und Dot Blot NC-Membranen getestet.

Die Blotmembran (siehe Abschnitt 5.6.3) oder Dot Blot Membran (siehe Abschnitt 5.6.4) wurde mit einem Block-Puffer (siehe Material und Methode Tabelle 25) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 4 x für je 10 min mit TBS/Tween 20 gewaschen. Im Anschluss wurde der MeCAT-markierte primäre Antikörper mit TBS/Tween 20 auf eine Stoffmengenkonzentration von 0,5 μg mL⁻¹ verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der NC-Membran inkubiert. Dann wurde die Membran 5 x für je 10 min mit TBS/Tween20 gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend detektiert.

5.2.4.3 Optimierung der IHC mit einem Metall-markiertem anti-Her2-Antikörper für die LA-ICP-MS

Die Vorbereitung des Gewebeschnittes sowie die Inkubation der Metall-markierten Antikörper erfolgte wie bei einer herkömmlichen IHC-Färbung (siehe Abschnitt 5.6.6 und 5.6.6.1). Um eine optimale Detektion zu erhalten wurden 2 μm, 5 μm und 8 μm dicke Gewebeschnitte getestet und mit einem MeCAT(¹⁶⁵Ho)-markierten anti-Her-2 Antikörpern für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden drei 5 μm dünne Gewebeschnitte mit einem MeCAT(¹⁷⁴Yb)-markierten anti-Her-2-Antikörper für 3 h bei Raumtemperatur, 1 h

und 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation des Gewebeschnittes mit den modifizierten Antikörpern erfolgte ein Waschschriff mit einem TBS/Tween Puffer für 2 x 5 min. Anschließend wurde der Gewebeschnitt getrocknet und mit der LA-ICP-MS detektiert.

5.3 Iodierung von Gewebeschnitten für die LA-ICP-MS

Die Iodierung der Gewebeschnitte erfolgte nach der immunohistochemischen Färbung (IHC) von Gewebeschnitten. Dafür wurde eine 50 mM Kaliumiodidlösung (Applichem, Darmstadt) mit Milli Q Wasser hergestellt. Unter Rühren wurde Iod (Applichem, Darmstadt) bis zur Sättigung zugegeben. Die Gewebeschnitte wurden mit 200 µL der KI₃ Lösung für 1 min inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch die Zugabe von 200 µL einer 50 mM Natriumdithionit Lösung (Merck, Darmstadt). Nach ca. 3 min wurde die braune Lösung entfärbt und mit 10 mL einer PBS-Tween Pufferlösung (pH 7,3; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂KHPO₄, KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt), 0,05% Tween 20 (Applichem, Darmstadt) und Milli Q Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Gewebeschnitt für die LA-ICP-MS Detektion getrocknet.

5.4 Drucken von Standards für die LA-ICP-MS

Für die LA-ICP-MS wurde ein interner Standard und ein Kalibrierstandard, basierend auf einer spezifisch modifizierten Tinte, entwickelt. Die gelbe Tinte wurde in Kooperation mit Diplom Ingenieur (FH) Boris Neumann von der Proteome Factory hergestellt und wird unter den Produktnamen *Laser Ablation-indium Ink (LA-In-Ink)* mit einer Stoffmengenkonzentration von 4 mg In L⁻¹ und *Laser Ablation-multi-Lanthanide Ink (LA-multi-Ln-Ink)* mit einer Stoffmengenkonzentration von 50 mg Ln L⁻¹ vertrieben. Die Stoffmengenkonzentration, sowie das jeweilige Lanthanid ist frei wählbar.

Das Drucken der Standards erfolgte mit einem *Ink-Jet* Drucker der Firma Canon Pixma MG 5150 mit integriertem CD/DVD Drucker. Für diesen Drucker sind leere Druckerpatronen erhältlich, die vor dem Drucken mit je 1 mL der entsprechenden spezifischen Tinte gespült wurden. Anschließend wurde erneut Tinte in die Druckerpatrone gefüllt und 10 Din-A4-Seiten farbige Testausdrucke angefertigt, um die Druckerdüsen zu equilibrieren. Als Testdruckmotiv wurde ein Fernsehtestbild (siehe Abbildung 54) verwendet.

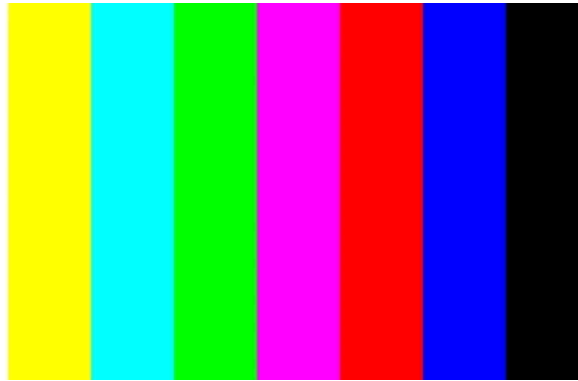


Abbildung 54 Fernsehtestbild für Testausdrucke zum Durchspülen der Druckdüsen, Quelle: <http://www.burosch.de/testbilder.html>.

Es wurde die Canon Druckersoftware mit folgenden Einstellungen verwendet: unter der Registerkarte *Schnelleinrichtung* (siehe Abbildung 55) wurde Fotodruck gewählt, als zusätzliche Funktion wurde Randloser Druck, Medientyp: Fotoglanzpapier Puls II, Druckerpapierformat: 10x 15 cm (4''x6'') Hochformat mit einer Standard Druckqualität und automatischer Papierzufuhr eingestellt. Die gleichen Einstellungen wurden unter der Registerkarte *Seite einrichten* (siehe Abbildung 56) gewählt. Es wurden keine weiteren speziellen Einstellungen zum Farbraum-Management vorgenommen.

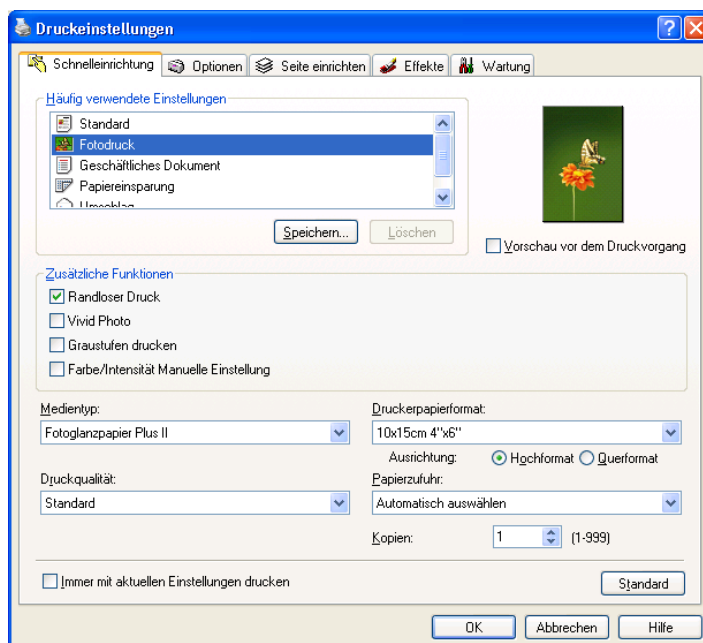


Abbildung 55 Druckeinstellungen des Canon Pixma MG5150.

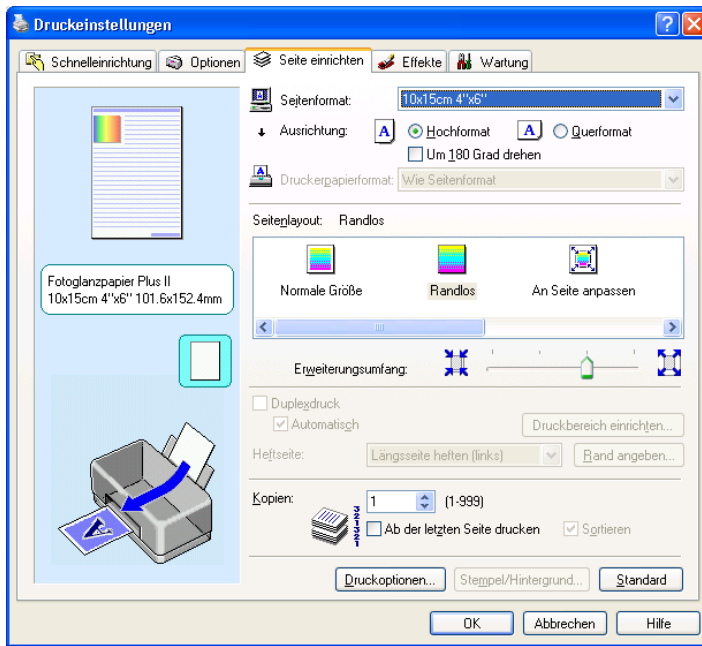


Abbildung 56 Druckeinstellungen des Canon Pixma MG5150.

5.4.1 Drucken von Standards auf NC-Membranen

Es wurde eine Indium-gespikte Tinte mit einer Stoffmengenkonzentration von 4 mg L^{-1} als interner Standard und eine Praseodym-, Erbium- und Thulium- gespikte Tinte mit einer Stoffmengenkonzentration von 50 mg L^{-1} getestet und für eine Quantifizierung eingesetzt. Nach den biochemischen Arbeitsschritten (siehe Abschnitt 5.6) wurde die behandelte NC-Membran getrocknet und zur Kalibrierung wurden 10 Quadrate von $3 \times 3 \text{ mm}$ in einem Konzentrationsbereich von 10-100% Deckung an den Rand der Membran gedruckt. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet und die Indium-gespikte Tinte wurde als interner Standard mit einer 20%igen Druckdichte vollständig über die gesamte Membran gedruckt. Nach Trocknung der Membran wurde In mittels LA-ICP-MS detektiert in Lösung (siehe Abschnitt 5.1.2). Zur Evaluierung der Methode wurde eine zweite Membran unter den gleichen Bedingungen angefertigt, aufgelöst und die Lanthanide (In, Pr, Er und Tm) mit der ICP-MS in Lösung (siehe Abschnitt 5.1.1) detektiert.

Um die Homogenität des Druckens zu testen, wurde die Indium-gespikte Tinte mit einer 20%igen Druckdichte vollständig über eine unbehandelte NC-Membran gedruckt und In mit der LA-ICP-MS und ICP-MS Analyse von Lösungen detektiert.

Die Reproduzierbarkeit des Druckens wurde mit einer Multielement-(Er, Tm, Pr) gespikten Tinte erprobt. Dazu wurden 10 Quadrate von 3 x 3 mm mit einer 40%igen Druckdichte gedruckt und mittels LA-ICP-MS detektiert.

5.4.2 Drucken eines internen Standards auf Gewebeschnitte

5.4.2.1 Vorbehandlung des Gewebeschnittes

Eine Vorbehandlung des Gewebeschnittes war nur notwendig wenn SuperFrost^(R) plus Adhäsions-Objektträger von der Firma R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik als Trägermaterial eingesetzt wurden, da die hydrophobe Beschichtung des Objektträgers zu einer nicht homogenen Bedruckung der Oberfläche führten.

Um trotzdem eine homogen bedruckte Oberfläche zu erhalten, wurde der Objektträger mit Gelatine beschichtet und anschließend bedruckt. Dazu wurde eine 5%ige Gelatine-Lösung in TBS/Tween 20 hergestellt und auf eine Temperatur von 30°C erwärmt. Für eine homogenere Gelatinebeschichtung wurde der Objektträger für 5 min mit einer 80°C warmen Heizplatte vorgewärmt. Anschließend wurde der Objektträger in die warme Gelatine getaucht und zum trocknen auf die Heizplatte gelegt. Die Prozedur wurde 3-mal wiederholt. Nach einer vollständigen Trocknung der Gelatineschicht wurde der Objektträger bedruckt. Eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte ist nicht notwendig, wenn polymerbeschichtete Superfrost Plus- Objektträger (Thermo Scientific) verwendet werden.

5.4.2.2 Bedrucken von Gewebeschnitten

Es wurde eine Indium-gespikte Tinte mit einer Stoffmengenkonzentration von 4 mg L⁻¹ als interner Standard eingesetzt. Der Gewebeschnitt wurde auf einem Objektträger immobilisiert und vollständig mit einer Druckdichte von 20% bedruckt. Das Bedrucken des Gewebeschnittes erfolgte mit dem integrierten CD-Drucker des Canon Pixma MG 5150 mit den oben angegebenen Einstellungen (siehe Abschnitt 5.4). Um den Objektträger beim Druckvorgang zu fixieren, wurde aus einer herkömmlichen CD eine Matrix angefertigt. Dafür wurden zwei Rechtecke mit den Maßen des Objektträgers aus der CD gefräst. Die CD wurde zusammen mit den Objektträgern in das CD-Fach des Druckers eingelegt und vollständig bedruckt.

5.5 Anwendung der MeCAT-markierten Antikörper auf Gewebeschnitten für die LA-ICP-MS Detektion

Nach erfolgreicher Optimierung der Markierungsstrategie wurden medizinisch relevante Antikörper, und solche die gegen Haushaltsproteine gerichtet sind mit MeCAT-modifiziert, um sie zur Detektion von Biomolekülen in Gewebeschnitten einzusetzen. Mit Hilfe der Kooperationspartner PD Dr. Simon vom Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Theuring von der Charité, wurden die jeweiligen klinisch-relevanten Antikörper ausgewählt.

Die Anwendung der MeCAT-markierten Antikörper erfolgte als 8-fach Multiplex-Ansatz und für die klinisch-relevanten Antikörper als Single-Ansatz für die LA-ICP-MS Detektion. Zur Validierung der Methode wurde jeder der klinisch-relevanten Antikörper in einer konventionellen IHC einzeln überprüft. Dafür wurden je 100 µg (0,67 nmol) mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP (400,00 nmol) teilreduziert und mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT (13,33 nmol) modifiziert.

5.5.1 Tissue Micro Arrays (TMA) vom Prostatakarzinom

Die 5 µm dünnen vorbehandelten *Tissue Micro Arrays* (TMA) vom Prostatakarzinom (siehe Abschnitt 5.6.6.1) mit 120 unterschiedlichen humane Biopsieproben wurden mit acht unterschiedlichen MeCAT-markierten Antikörpern (siehe Tabelle 19) als Gemisch für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ein einzelner TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Einzelproben, sogenannte Kontrollproben, die negativ für die klinischen Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper sind, sowie 100 unterschiedlichen Biopsieproben von Patienten, die positiv für die klinischen Antikörper sind. Nach Inkubation der Gewebeschnitte mit den modifizierten Antikörpern erfolgte ein Waschschriff mit einem TBS/Tween Puffer für 2 x 5 min. Nach Trocknung der Gewebeschnitte wurden diese mit einer Indium-gespikten Tinte bedruckt (siehe Abschnitt 5.4.2.2) und anschließend, mittels LA-ICP-MS (siehe Abschnitt 5.1.2), detektiert. Der Versuch erfolgte zusätzlich für die 4 klinisch-relevanten Antikörper als Single-Ansatz.

Tabelle 19 Zusammenfassung der eingesetzten MeCAT-markierten Antikörper für die TMA-Gewebeschnitte

Antikörper (AK)	β (AK) [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Verunreinigung	Aufreinigung	MeCAT	β (AK-MeCAT) [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Gewebeprobe
Erg-1/2/3 (c-20)	1	0,1% Gelatine	Clean up	Eu	0,258	Prostata
Androgenreceptor	1	-	-	Tm	0,152	Prostata
PSMA	1	-	-	Lu	0,454	Prostata
AMACR	1	0,1% Gelatine	Clean up	Pr	0,13	Prostata
Muc1	1	-	-	Tb	0,303	Prostata
Her2	0,5	-	-	Yb	0,08	Prostata
β-Actin	1	-	-	Nd	0,502	Prostata
GAPDH	1	-	-	Er	0,079	Prostata

5.5.2 Mausgewebeschnitte zur Untersuchung von Morbus Parkinson

In einer weiteren Anwendung wurden 176 Mausgehirngewebeschnitte (immer in Doppelbestimmung), wie unter Abschnitt 5.6.6.2 vorbehandelt und mit den MeCAT-markierten Antikörpern (siehe Tabelle 20) für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tabelle 20 Zusammenfassung der eingesetzten MeCAT-markierten Antikörper für die Mausgewebeschnitte.

Antikörper (AK)	β (AK) [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Verunreinigung	Aufreinigung	MeCAT	β (AK-MeCAT) [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Gewebeprobe
Syn 204	1	0,1% Gelatine	Clean up	Eu	0,295	Maushirn
GFAP	1	-	-	Ho	0,422	Maushirn
NeuN	1	-	-	Pr	0,592	Maushirn
TH	1	0,1% Gelatine	Clean up	Tb	0,456	Maushirn
Phosphoserin	1	1% Glycerol	-	Tm	0,204	Maushirn
Oxct1	1	-	-	Lu	0,825	Maushirn
β-Actin	1	-	-	Nd	0,502	Maushirn
GAPDH	1	-	-	Er	0,079	Maushirn

Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, folgten drei Waschschritte mit einem 12 mM PBS Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgte nach folgendem Schema (siehe Tabelle 21) und wurde durchgeführt von der chemisch-technischen Assistentin Mandy Magbagbeolu in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Theuring.

Dafür wurden je zwei konsekutive Mausgewebeschnitte vom Versuchstier, z.B. mit der Nummer 267 aus der Tierversuchsreihe mit der Identifikationsnummer BSYN00201, auf Adhäsions-Objektträger immobilisiert und jeweils als Single-Ansatz mit den Antikörpern (siehe Tabelle 21) inkubiert. Zusätzlich wurden einige Gewebeschnitte gleichzeitig mit allen vier medizinisch relevanten Antikörpern (siehe Tabelle 21) und vier weitere Antikörper gegen Haushaltsproteine (siehe Tabelle 20) inkubiert. Wobei die Tiere in männlich (m), weiblich (f) und in Wildtyp (wt), Homotyp (ho) in der Tabelle zugeteilt sind. Der sogenannten Wildtyp Maus ist nicht modifiziert und dient als Referenz für den genetisch veränderten Homotyp Maus.

Tabelle 21 Zusammenfassung der Probegewebeschnitte mit den entsprechenden Antikörpern. Jede IHC erfolgte als Doppelbestimmung.

BSYN0020 ID							
Mausnr.	Gender	Genotype	204	TH	NeuN	GFAP	Multiplex
262	m	wt	X	X	X	X	
263	f	wt	X	X	X	X	
264	f	wt		X	X	X	
267	m	wt		X	X	X	X
269	m	wt		X	X	X	
270	m	wt	X	X	X	X	X
272	f	wt		X	X	X	X
276	f	wt	X	X	X	X	X
279	f	wt	X	X	X	X	X
280	m	wt	X	X	X	X	X
Mausnr.	Gender	Line	204	TH	NeuN	GFAP	Multiplex
842	m	62 homo	X	X	X	X	
844	f	62 homo	X	X	X	X	X
846	m	62 homo	X	X	X	X	X
847	m	62 homo	X	X	X	X	X
848	f	62 homo	X	X	X	X	X
850	m	62 homo	X	X	X	X	X
851	f	62 homo	X	X	X	X	
856	m	62 homo	X	X	X	X	
897	f	62 homo	X	X	X	X	X
900	f	62 homo	X	X	X	X	

Nach Trocknung der Gewebeschnitte wurden diese mit Gelatine beschichtet (siehe Abschnitt 5.4.2.1) und mit einer Indium-gespikten Tinte bedruckt (siehe Abschnitt 5.4.2.2) und anschließend mittels LA-ICP-MS (siehe Abschnitt 5.1.2) detektiert. Dies erfolgte ebenfalls als 8-fach Multiplex-Ansatz und für die vier klinisch-relevanten Antikörper als Einzel-Ansatz.

5.6 Biochemische Arbeitsschritte

5.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford [169] bestimmt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) in den Stoffmengenkonzentrationen $10\text{-}500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ eingesetzt. Für die Messung wurden $10\text{ }\mu\text{L}$ Probe, mit unbekannter Proteinkonzentration, in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit $100\text{ }\mu\text{L}$ Bradford-Reagenz versetzt. Von allen Proben wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur, wurde die Extinktion der Proben im ELISA-Reader (Spectramax Plus384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

5.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um den Reduktionsgrad der unterschiedlich stark reduzierten anti-Lysozym-Antikörper abschätzen zu können, wurden die partiell reduzierten Antikörper (siehe Abschnitt 5.2.1, Tabelle 17), sowie die MeCAT-markierten Antikörper (siehe Abschnitt 5.2.2, Tabelle 18), mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE, elektrophoretisch aufgetrennt [74]. Für die Anwendungen der neu entwickelten Standards für die LA-ICP-MS (siehe Abschnitt 5.1.2) wurden Standardproteine wie BSA, Ovalbumin, α -Casein und Lysozym (je $14,5\text{ pmol}$ Protein) mit MeCAT-modifiziert, sowie nicht modifiziertes Lysozym elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine NC-Membran mittels Western Blot immobilisiert (siehe Abschnitt 5.6.3.2) und mit MeCAT-markierten Antikörpern in einer Immunreaktionen (siehe Abschnitt 5.2.4.2) umgesetzt.

Die MeCAT-modifizierten Antikörper aus den verschiedenen Ansätzen wurden 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer [76], ohne Reduktionsmittel (2-fach konzentriert), resuspendiert und für 5 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgeköcht. Es wurden je $2\text{ }\mu\text{g}$ ($13,33\text{ pmol}$) modifizierter Antikörper pro Geltasche aufgetragen.

Für die modifizierten und nicht modifizierten Standardproteine wurde ein Laemmli-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol oder DTT als Reduktionsmittel (2-fach konzentriert) eingesetzt. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurden 12%ige Polyacrylamidgele ($7\text{ cm} \times 8\text{ cm}$, Schichtdicke 1 mm) hergestellt (Tabelle 22).

Tabelle 22 Zusammensetzung der Gellösung für ein SDS-PAGE-Gel.

Chemikalie	12% Trenngel [μL]	4% Sammelgel [μL]
MilliQ H₂O	2156	1093
40 % Polyacrylamidlösung (29:1)	1504	188
1,5 M TRIS; pH = 8,5	1250	-
0,5 M TRIS ; pH = 6,8	-	190
10% (w/v) SDS-Lösung	50	15
TEMED	2,5	2,5
10 % (w/v) APS-Lösung	50	2,5

Es wurden 10 μL der jeweiligen teilreduzierten Antikörper, der markierten Antikörper, oder der Standardproteine und 1 μL Molekulargewichtsstandard (Applichem, Produktnr. 8889, Darmstadt) auf das Gel aufgetragen. Auf einigen Gelen wurde zusätzlich 5 μL reduziertes BSA (3 pmol) und 2 μL vollständig reduzierter Standardantikörper (13,33 pmol) zur Kontrolle aufgebracht.

Für die Optimierung der Markierungsstrategie unter dem Abschnitt 5.2, wurde die elektrophoretische Trennung mit der Mini Protean 3 (Bio Rad, München) durchgeführt. Die 12%igen Gele wurden silbergefärbt, gemäß Herstellerangaben des Kits (FireSilver, Proteome Factory AG, Berlin).

Tabelle 23 Zusammenfassung der eingesetzten Elektrophoretischen Systeme und Laufbedingungen.

SDS-PAGE Systeme	Mini-Protean 3 (Bio Rad)	MiniVE Vertical System (Amerham Biosciences)
Durchgeführt	Proteome Factory AG	BAM
Laufbedingungen	U = konst, 150 V (max. 400 mA)	I = konst, 22 mA
Zeit	75 min	90 min
Temperatur	Raumtemperatur bei ca. 21°C	
Laufpuffer	200 mM Glycin, 25 mM Tris Base, 0,1% SDS	

U: elektrische Spannung, I: elektrische Stromstärke

Die Metallquantifizierung von MeCAT-markierten Antikörpern-Antigen Konjugaten mit Hilfe eines gedruckten internen Standards und Kalibrierstandards (siehe Abschnitt 5.4.1), erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung von Standardproteinen, mit dem Elektrophorese System MiniVE Vertical System (Amerham Biosciences).

5.6.3 Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 5.6.2) in einem 12%igen Gel wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose (NC) Membran per Elektroblothing übertragen [81]. Dieser Western Blot erfolgte nach der Semidry-Blot-Technik [82] mit zwei unterschiedlichen Systemen.

5.6.3.1 Semidry-Blot mit der Trans-Blot SD System

Zwei dicke Filterpapiere wurden in einen 1-fachen SDS-Blotpuffer (25 mM Tris, 0,1% SDS, 200 mM Glycin, 20% Methanol, pH 9) angefeuchtet und auf den Träger der Blotkammer (Anode) gelegt. Luftblasen wurden durch das Rollen eines Kunststoffstabs auf dem Filterpapier entfernt. Auf das Filterpapier wurde die ebenfalls angefeuchtete NC-Membran ohne Luftblasen aufgebracht. Dazu wurde das Gel mittels SDS-Blotpuffer angefeuchtet und ohne Luftblasen auf die NC-Membran gelegt und mit zwei dicken, feuchten Filterpapieren abgedeckt. Abschließend wurde die Kathode positioniert. Die Blotkammer wurde dann über Nacht bei 10 V im Kühlschrank bei 4°C betrieben. Zur Kontrolle der elektrophoretischen Proteinübertragung auf die NC-Membran wurde sie reversibel mit Ponceau S angefärbt und zugeschnitten.

5.6.3.2 Semidry-Blot mit dem Multiphor II Electrophoresis System

Sechs Filterpapiere wurden mit einem Anodenpuffer I und drei mit Anodenpuffer II befeuchtet und auf die Anode gelegt (siehe Tabelle 24). Die NC-Membran und das Gel wurden für 5 min im Anodenpuffer II getränkt und ohne Luftblasen auf die Filterpapiere aufgebracht und mit 9 Filterpapieren, befeuchtet mit dem Kathodenpuffer abgedeckt. Anschließend wurde die Kathode positioniert und mit einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für eine Stunde bei Raumtemperatur geblottet.

Tabelle 24 Zusammenfassung der eingesetzten Puffer und Filter.

	Puffer Zusammensetzung	befeuchtet
Anodenpuffer I	300 mM Tris, 20% Methanol	6 Lagen Filterpapier
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20% Methanol	3 Lagen Filterpapier, NC-Membran, Gel
Kathodenpuffer	40 mM ϵ -Aminocaptonsäure, 20% Methanol	9 Lagen Filterpapier

5.6.4 Dot Blot Membran

Eine Dot Blot Membran ist eine vereinfachte Form eines Immunoblots (siehe Abschnitt 5.2.4.2, Grundlagen 2.5) zur Detektion von Proteinen. Dabei wird eine NC-Membran zunächst mit einem 20 mM Tris Puffer benetzt und flach auf eine Glasplatte gelegt. Anschließend wurde eine Proteinlösung auf die benetzte Membran mit einem Volumen von 2 μ L mehrmals getropft. Die präparierte Membran wurde mit einer Schale abgedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

5.6.5 Immunfärbung mit Alkalischer Phosphatase (AP)

Die Immunfärbung mit Alkalischer Phosphatase [92] diente als Schnelltest, um die Spezifität des eingesetzten polyklonalen Standardantikörpers (anti-Lysozym-Antikörper) vor und nach der charakteristischen MeCAT-Markierung zu testen.

Vor der Immunreaktion wurde die präparierte Membran für 2 x 10 min mit TBS/Tween 20 gewaschen, um sie dann mit dem Block-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur zu inkubieren. Am nächsten Tag wurde die Membran 4 x 10 min mit TBS/Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper 1:2000 mit TBS/Tween 20 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der NC-Membran inkubiert (Tabelle 25).

Tabelle 25 Zusammenfassung des verwendeten primären AK und Puffer.

Immunofärbung mit AP	
primäre Antikörper:	
anti-Lysozym/ anti-Lysozym-MeCAT(Ln)	1:2000 (0,5 μ g ml ⁻¹)
Block- Puffer	10 g Gelatine auf 100 ml mit TBS/Tween 20
TBS/Tween 20	9,68 g Tris-Base; 4 ml Tween; auf 4 L mit dest. H ₂ O; mit HCl auf pH 7,3
Alkalische Phosphatase- Puffer	4,84 g Tris-Base; 81 mg MgCl ₂ x H ₂ O; auf 200 mL mit dest. H ₂ O ; mit HCl auf pH 8,1
sekundäre Antikörper: anti-Huhn IgY	1:5000

Dann wurde die Membran 5 x 10 min mit TBS/Tween20 gewaschen und für zwei Stunden mit dem verdünnten sekundären AK versetzt (Tabelle 25). Darauf folgte ein erneutes Waschen der Membran mit dem TBS/Tween20 Puffer für 5 x 10 min und Inkubation mit Alkalische Phosphatase Puffer für 5 min. Jede Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablette

(Sigma Aldrich) wurde in je 10 mL destilliertem Wasser im Ultraschallbad gelöst, im Dunkeln gelagert und die beiden Aliquots direkt vor der Verwendung vereinigt. Danach wurden die Membran auf eine Glasplatte gelegt und mit der Fast Red TR/Naphthol AS-MX Lösung benetzt und für ca. 90 min im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde die Membran mit destilliertem Wasser gespült und später getrocknet.

5.6.6 Konventionelle IHC-Färbung

Als Referenz für die Richtigkeit der neuartigen, direkten Detektionsmethode wurden die klinisch-relevanten Antikörper mit der kommerziellen IHC-Färbung zusätzlich detektiert.

Zunächst wurden die Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeblöcke mit einem kommerziellen Schlittenmikrotom in 5 µm dünne Gewebeschnitten geschnitten. Das Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf immobilisierte die Gewebeschnitte auf Superfrost Plus- Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) während die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Theuring von der Charité Adhäsions-Objektträger einsetzte.

Die Probenvorbereitung, sowie die IHC-Färbung, erfolgten bei dem jeweiligen Kooperationspartner.

5.6.6.1 Mammakarzinom und Prostatakarzinom Gewebeschnitte

Gewebeschnitt Vorbereitung und Inkubation mit dem Primärantikörper:

Zunächst erfolgte die Deparaffinierung der Formalin-fixierten Gewebeschnitte für 3 x 5 min in Xylol. Zur Rehydrierung wurde das Gewebe mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%) 2 x je 5 min gespült. Die Demaskierung der Antigene erfolgte für Brustgewebe in einem Tris-EDTA-Citratpuffer (pH 6) im Dampfgerar bei 90°C für 20 min und für Prostatagewebe wurde unter Kompromisbedingungen mit einem Tris-EDTA-Citratpuffer (pH 7,8) im Autoklaven, bei 120°C für 5 min gearbeitet. Nach Abkühlen des Gewebes auf Raumtemperatur wurde es mit destilliertem Wasser und einem TBS/Tween Puffer (Spüllösung von Dako, 1-fach) für je 5 min gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden das Gewebe bei Raumtemperatur für exakt 10 min mit Dako RealTM Peroxidase-Blocking Lösung (Dako) inkubiert. Anschließend wurde für je 2 x 5 min mit einem Waschpuffer gespült. Für die Primärantikörper-Inkubation wurden die entsprechenden

Antikörper mit einem Dako RealTM Antibody Diluent (Dako) Lösung auf eine Stoffmengenkonzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ verdünnt. Das Gewebe wurde mit je 300 μL des Primärantikörpers in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Gewebeschnitt mit einem TBS/Tween Puffer für 2 x 5 min gespült.

Gewebeschnitt-Färbung mit dem Sekundärantikörper:

Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit dem Sekundärantikörper (Dako REALTM EnVision TM HRP Rabbit/Mouse) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf erfolgte die Behandlung mit DAB-Substrat-Chromogen-Lösung gemäß Herstellerangaben des Kits (Dako; DAB + Chromogen (X500) wurde 1: 50 mit Substrate Buffer verdünnt) für 10 min, um den gebundenen Antikörper nachzuweisen. Im Anschluss wurde der Gewebeschnitt mit Leitungswasser gespült. Danach erfolgte die Färbung der Zellkerne nach Mayer mit einer Hämalaun-Lösung [170], dafür wurden die Gewebeschnitte ca. 1 Minute mit der Färbelösung inkubiert und anschließend mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Gewebeschnitte wurden zur Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96%, 100%) gespült und anschließend bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Um die gefärbten Gewebeschnitte zu untersuchen und zu bewerten, wurden diese mit dem Mirax Desk (Carl Zeiss) aufgenommen.

5.6.6.2 Mausgewebeschnitte zur Untersuchung von Morbus Parkinson

Gewebeschnitt Vorbereitung und Inkubation mit dem Primärantikörper:

Die Deparaffinierung der Formalin-fixierten Gewebeschnitte erfolgte für 3 x 5 min in Neo-Clear, ein Ersatzlösungsmittel für Xylol. Zur Rehydrierung wurde das Gewebe mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) 2 x je 30 s gespült und in destilliertes Wasser überführt. Für die Demaskierung der Antigene wurde ein 10 mM Citratpuffer (pH 6-6,8) eingesetzt. Der Puffer wurde für 2 min bei 650 Watt in einer Mikrowelle vorgewärmt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt in dem vorgewärmten Puffer für 2 x 5 min in der Mikrowelle (650Watt) gekocht. Mit Hilfe von Eis wurde das Gewebe mit dem Citratpuffer zusammen abgekühlt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einer 0,3% Peroxidase Blocking-Lösung für 5 min inkubiert. Darauf folgten drei kurze Waschschrte mit einem PBS Puffer (12 mM Phosphat, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Der Primärantikörper wurde

mit einem 0,1% BSA PBS Puffer 1:50 oder 1:300 (abhängig vom Antikörper) verdünnt. Anschließend wurden jeweils zwei Gewebeschnitte auf einem Objektträger mit 250 µL des Primärantikörpers für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um den ungebundenen Antikörper zu entfernen, folgten drei Waschschrte mit einem PBS Puffer.

Gewebeschnitt Färbung mit dem Sekundärantikörper:

Der Biotin markierte Sekundärantikörper wurde 1: 100 mit einem 0,1% BSA PBS Puffer verdünnt und 250 µL mit dem Gewebeschnitt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgten nochmals drei Waschschrte mit 12 mM PBS Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Anschließend wurden 250 µL Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex für 30 min zum Gewebeschnitt gegeben. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte in PBS Puffer. Darauf folgte die Behandlung des Gewebeschnittes mit einer DAB-Lösung (3,3'-Diaminobenzidine, Roche Applied Science) für 2-5 min. Durch das Spülen des Gewebeschnittes mit Leitungswasser wurde die Reaktion beendet. Dann folgte die Färbung der Zellkerne mit einer Hämatoxylin-Lösung [170] für 8 min. Durch das anschließende Spülen mit fließendem Leitungswasser wurde die Färbung beendet.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte entwässert durch das Spülen mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Um die gefärbten Gewebeschnitte zu untersuchen und zu bewerten, wurden Fotos vom Gewebeschnitt mit einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss) aufgenommen.

6 Verwendete Chemikalien

6.1 Chemikalien

Chemikalie	Lieferant
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth
Ammoniumbicarbonat (AmBiCa)	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Bromphenolblau	BioRad
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol (EtOH)	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Harnstoff	BioRad
Indium (1000 mg L ⁻¹)	Carl Roth
Multielementstandard (Lanthanoide, 500 mg L ⁻¹)	Alfa Aesar
2-Mercaptoethylamin	Pierce
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel- de Haën
NC-Membran (0.45 µm, 30 x 3,5 m)	Thermo Scientific
N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Prasodymstandard (1000 mg L ⁻¹)	Carl Roth
Salpetersäure Ultra-Qualität 69 %	Rotipuran Roth
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Carl Roth
Tune-Lösung	Thermo Fisher Scientific
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Sigma Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth

6.2 Protein, Enzyme und Marker

Proteine, Enzym und Marker	Lieferant
Anti- β -Aktin	Sigma
Anti-Androgenrezeptor (AR)	antibodies
Bradford	Proteome Factory AG
Anti- BSA	Dunn Labortechnik
BSA	Sigma Aldrich
anti- β -Casein (Kaninchen)	Dunn Labortechnik
β -Casein	Sigma Aldrich
Coomassie	Carl Roth
Anti-Erg	Santa Cruz
Fast Red TR/Naphthol AS- MX	Sigma Aldrich
Anti-GAPDH	Abcam
Anti-GFAP	Dako
Anti-Her2	DAKO
Anti-Huhn IgY	Sigma Aldrich
Anti-Kaninchen IgY	Sigma Aldrich
anti-Lysozym (Kaninchen)	Dunn Labortechnik
Lysozym	Sigma Aldrich
Anti-MUC1	Abcam
Anti-NeuN	Millipore
Ovalbumin	BIOTREND Chemikalien GmbH
Anti-Oxct1	Abcam
Anti-P504S	Dunn Labortechnik
Anti-PSMA	Abcam
Anti-Phosphoserin	Millipore
Roti-Mark-Standard	Carl Roth
Anti-Syn 204	Santa Cruz
Anti-TH	Santa Cruz

6.3 Verwendete Kits

Verwendete Kits	Lieferant
Pierce ^(R) Antibody clean up	Thermo Scientific
FireSilver	Proteome Factory AG
<i>Laser Ablation-Indium Ink</i>	Proteome Factory AG
<i>Laser Ablation-Multilanthanide Ink</i>	Proteome Factory AG
MeCAT	Proteome Factory AG

7 Abkürzungsverzeichnis

$\text{Ln [cps]/(In [cps]/\overline{\text{In [cps]})}$	Ln/In
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMACR	Alpha-Methylacyl-Coenzym-A-Racemase
AR	Androgenrezeptor
AP	Alkalischer Phosphatase
BSA	Rinderserumalbumin
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
CD	<i>Compact Disc</i>
cps	counts per second
Da	Dalton
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecan-N,N',N'',N'''-teraessigsäurederivat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ICP-MS	ICP-MS mit flüssigem Probeneintragssystem
F_{ab}	<i>Fragment antigen binding</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung [9,806 m/s ²]
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Gliafaserprotein
ho-Typ	Homotyp Maus
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
\bar{I}	Mittelwert Intensitäten
IHC	Immunohistochemische Färbung
ISAS	Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften
LA-ICP-MS	Laser-ICP-MS
vsp	Laserscangeschwindigkeit
Ø	Laserspotgröße
Ig	Immunglobuline
2-ME	β-Mercaptoethanol
MeCAT	<i>Metal Coded Tag</i>
min	Minuten
Milli Q Wasser	Hochreines Wasser
\bar{x}	Mittelwert
MS	Massenspektrometrie
M	Molekulargewicht
Mplex	Multiplex-Ansatz
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nitrozellulose
NeuN	Neuronenspezifisches Kernprotein
ns	nicht Signifikant

NWG	Nachweisgrenze
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenaktivität
PSMA	Prostata-spezifisches Membran Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SD	Standardabweichung
Splex	Singelplex-Ansatz
y-SD	Reststreuung
RSD	Relative Standardabweichung
SBR	<i>signal-to-background-ratio</i> (Signal zu Untergrund)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
SD	Standardabweichung
Syn	Synuclein
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)
Tween20	Handelsname von Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
x	Mehrfach konzentriert
VSD	Verfahrensstandardabweichung
Wdhl.	Wiederholung
wt-Typ	Wildtyp Maus

8 Anhang

Abschnitt 3.2.1: Selektive Reduktion mit Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)

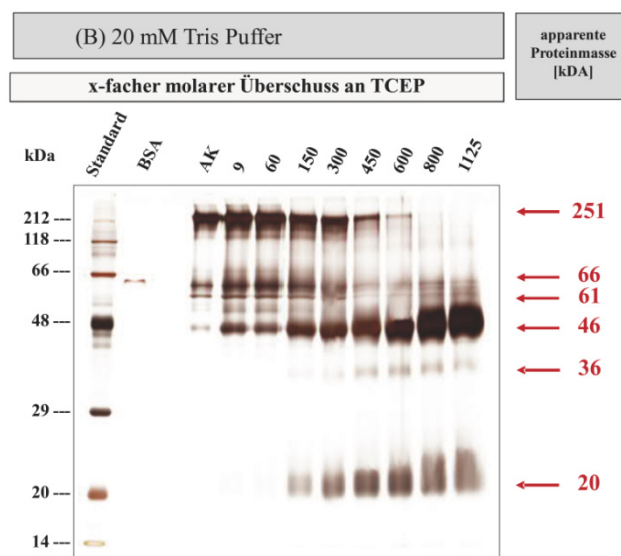


Abbildung 57 Einfluss des Überschusses an Reduktionsmittel TCEP auf die Reduktion der Disulfidbrücken des anti-Lysozym Antikörpers unter physiologischen Reaktionsbedingungen. Es wurden jeweils 666,67 pmol Antikörper mit einem molaren Überschuss von 9 bis 1125 an TCEP eingesetzt und mittels 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Reduktion erfolgte mit einem 20 mM Tris;150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4); Spur1: Proteinstandard, Spur2: BSA, Spur3: unbehandelte Antikörper; Spur4-11: 9-bis 1125-facher molarer Überschuss an TCEP.

Abschnitt 3.2.4: Aufreinigung der MeCAT-markierten Antikörper

Tabelle 26 Zusammenfassung der Proteinstoffmengenkonzentration der MeCAT-modifizierten Antikörper nach Entfernung der MeCAT-Reagenz Überschüsse mit unterschiedlichen Techniken.

Mini- Dialyseeinheit	Ho	Ho	Ho	Nd	Nd
β (AK) µg/µL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
β ist [µg/µL]	0,091	0,09	0,089	0,104	0,094
Proteinausbeute [%]	18	18	18	21	19
Kapsel	Ho	Ho	Ho	Nd	Nd
β (AK) µg/µL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
β ist [µg/µL]	0,079	0,086	0,089	0,073	0,082
Proteinausbeute [%]	16	17	18	15	16
50 kDa Cut Off Ultrafiltrationsröhrchen	Ho	Ho	Ho	Nd	Nd
β (AK) µg/µL	1	1	1	1	1
β ist [µg/µL]	0,316	0,416	0,32	0,42	0,38
Proteinausbeute [%]	32	42	32	42	38
30 kDa Cut Off Ultrafiltrationsröhrchen	Ho	Ho	Ho	Nd	Nd
β (AK) µg/µL	1	1	1	1	1
β ist [µg/µL]	0,408	0,452	0,454	0,448	0,44
Proteinausbeute [%]	41	45	45	45	44

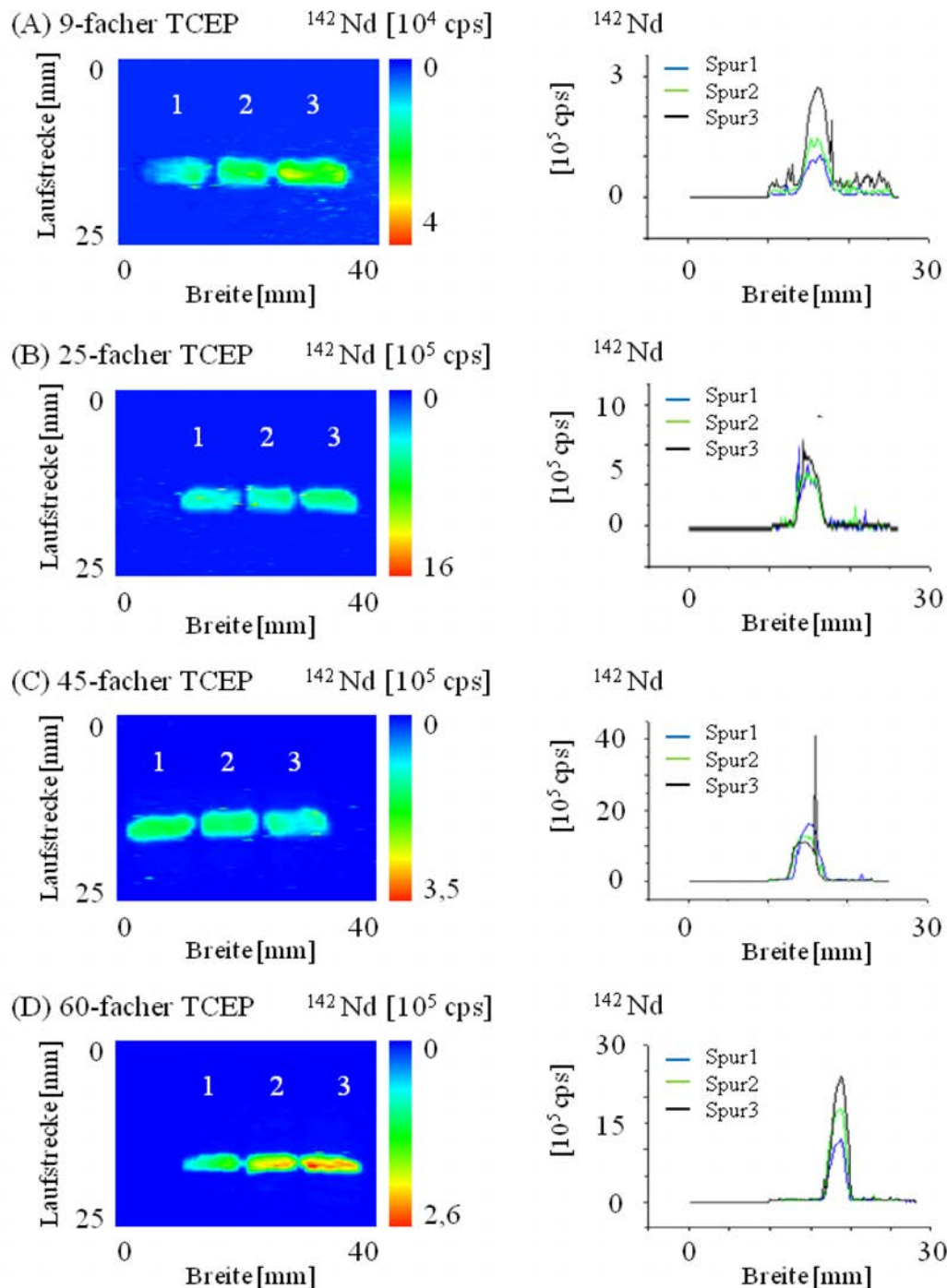
Abchnitt 3.2.6: Messung einer LA-ICP-MS Immunreaktion mit modifizierten Antikörpern

Abbildung 58 Intensitätsprofile von vier Membranen nach immunologischer Reaktion mit unterschiedlich stark modifizierten anti-Lysozym (^{146}Nd)-Antikörpern. (A) Zeigt einen 9-fachen, (B) einen 25-fachen, (C) einen 45-fachen und (D) einen 60-fachen molaren Überschuss an TCEP. Die Modifikation erfolgte mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT(^{146}Nd). Die rechten Abbildungen zeigen die Summen der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der drei Spuren der jeweiligen Membran. Spur 1-3 enthält jeweils 3,5 pmol/ μL (0,5 μg) Lysozym und wurde mit 3,33 fmol/ μL (16,66 pmol) modifiziertem Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 μm , Laserscangeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz.

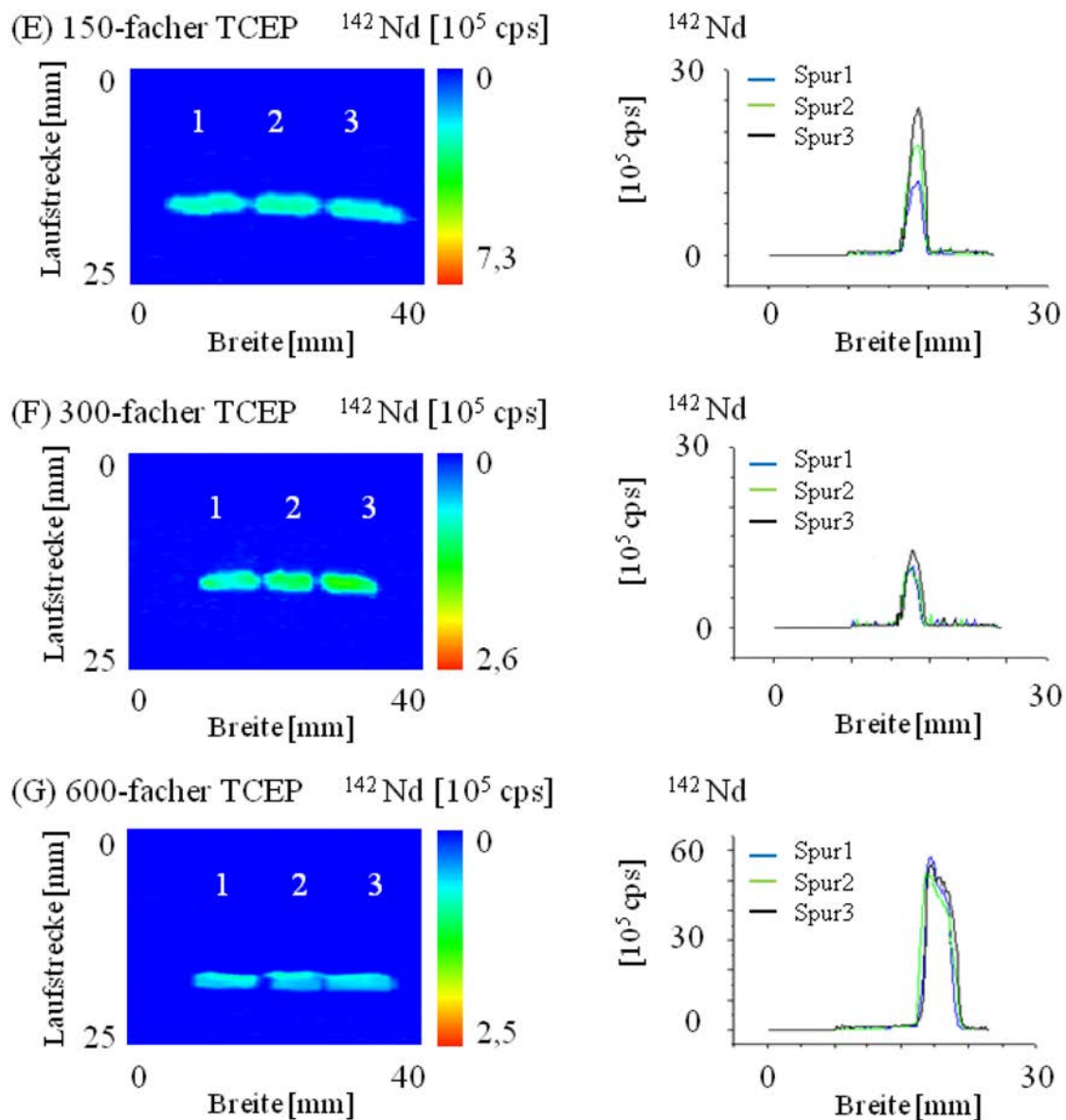
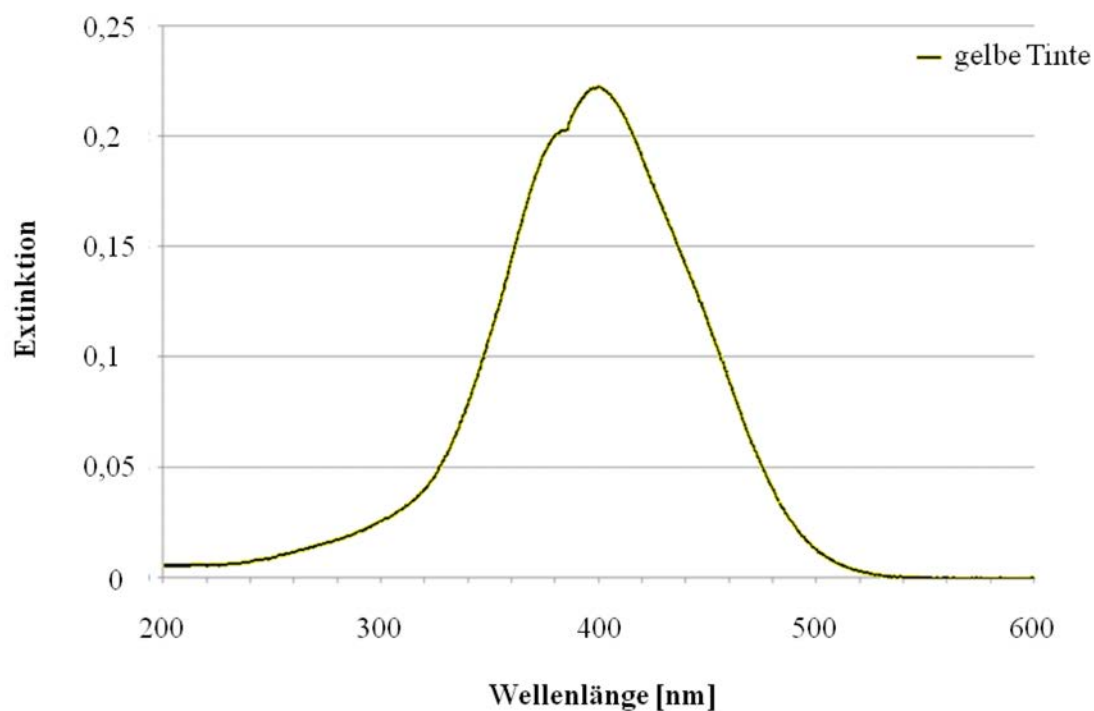


Abbildung 59 Intensitätsprofile von drei Membranen nach immunologischer Reaktion mit unterschiedlich stark modifizierten anti-Lysozym (^{146}Nd)-Antikörpern. (E) Zeigt einen 150- fachen, (F) einen 300- fachen, (G) einen 600-fachen molaren Überschuss an TCEP. Die Modifikation erfolgte mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT(^{146}Nd). Die rechten Abbildungen zeigen die Summen der Intensitäten der einzelnen Raster scan-Linien für jede der drei Spuren der jeweiligen Membran. Spur 1-3 enthält jeweils 3,5 pmol/ μL (0,5 μg) Lysozym und wurde mit 3,33 fmol/ μL (16,66 pmol) modifiziertem Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 μm , Laserscangeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz.

Abschnitt 3.2.7: Quantifizierung der Metall-markierten Antikörper**Tabelle 27** Zusammenfassung der durchschnittlichen Markierungsgrade.

	19.11.2011	07.12.2011
n (Nd) [pmol]	13,48	17,27
n (AK) [pmol]	15,54	17,91
Markierungsgrad (9-TCEP)	0,87	0,96
n (Nd) [pmol]	10,57	30,39
n (AK) [pmol]	11,27	34,14
Markierungsgrad (25-TCEP)	0,94	0,89
n (Nd) [pmol]	0,07	68,18
n (AK) [pmol]	0,71	61,98
Markierungsgrad (45-TCEP)	0,99	1,10
n (Nd) [pmol]	32,79	106,00
n (AK) [pmol]	23,58	83,46
Markierungsgrad (60-TCEP)	1,39	1,27
n (Nd) [pmol]	35,64	74,19
n (AK) [pmol]	24,08	47,25
Markierungsgrad (150-TCEP)	1,48	1,57
n (Nd) [pmol]	13,42	65,90
n (AK) [pmol]	9,07	41,97
Markierungsgrad (300-TCEP)	1,77	1,84

Abschnitt 3.4.1.1: Einfluss der farbigen Tinte auf die Laserabsorption**Abbildung 60** Absorptionsspektrum der gelben Tinte.

Abchnitt 3.4.1.2: Homogenität und Reproduzierbarkeit des Druckprozess**Tabelle 28** Zusammenfassung der ICP-MS Daten (bezogen auf 1 cm²) der aufgelösten Indium bedruckten NC-Membran.

	Karo 1	Karo 2	Karo 3	Karo 4
¹¹⁵ In [cps]	2,29E+04	2,31E+04	2,30E+04	2,14E+04
¹¹⁴ Pr [cps]	4,59E+06	4,69E+06	4,69E+06	4,79E+06
normiertes ¹¹⁵ In (¹¹⁵ In/ ¹⁴¹ Pr) [cps]	4,99E-03	4,92E-03	4,91E-03	4,47E-03
m (Membranstücke) [g]	1,30E-03	1,33E-03	1,42E-03	1,17E-03
normiertes ¹¹⁵ In/m [cps/g]	3,84E+00	3,70E+00	3,46E+00	3,82E+00
\bar{X} [cps/g]	3,70E+00			
SD [cps]	1,76E-01			
RSD [%]	5			

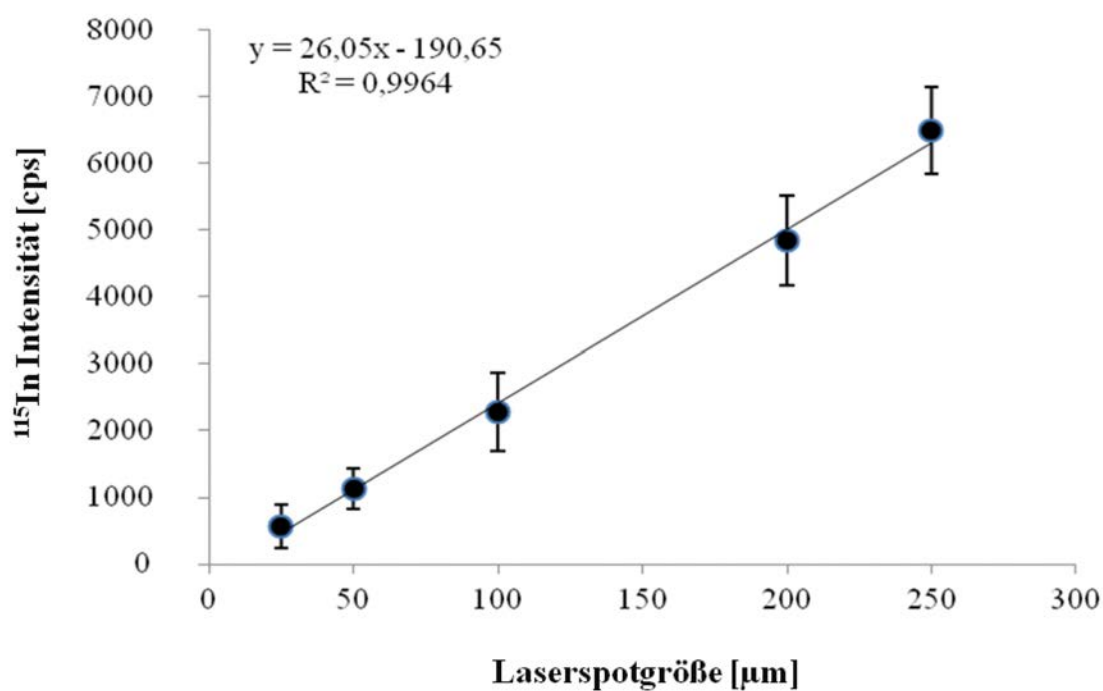
**Abbildung 61** Linearer Zusammenhang zwischen der Indium-Signalintensitätshöhen und ansteigender Laserspotgröße einer bedruckten NC-Membran als Modellversuch. Laserparameter: Laserspotgrößen: 25, 50, 100, 200, 250 µm, Frequenz von 20 Hz, Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Tabelle 29 Zusammenfassung der berechneten RSD für die Einzelschuss Experimente.

	In(25)	In(50)	In(100)	In(200)	In(250)
	[cps]	[cps]	[cps]	[cps]	[cps]
Spot-1	2,38E+02	7,75E+02	1,27E+03	4,18E+03	6,77E+03
Spot-2	1,32E+03	7,28E+02	2,22E+03	5,38E+03	5,61E+03
Spot-3	4,75E+02	7,96E+02	2,17E+03	4,97E+03	7,26E+03
Spot-4	5,83E+02	1,04E+03	2,85E+03	4,72E+03	7,07E+03
Spot-5	9,73E+02	1,37E+03	2,11E+03	4,11E+03	5,97E+03
Spot-6	5,66E+02	1,49E+03	2,30E+03	6,56E+03	6,04E+03
Spot-7	6,85E+02	1,49E+03	3,40E+03	4,30E+03	6,52E+03
Spot-8	2,54E+02	1,14E+03	2,54E+03	5,40E+03	6,73E+03
Spot-9	3,11E+02	7,24E+02	1,75E+03	4,54E+03	7,50E+03
Spot-10	5,37E+02	1,35E+03	2,59E+03	4,75E+03	5,56E+03
Spot-11	1,87E+02	1,46E+03	2,62E+03	4,59E+03	6,96E+03
Spot-12	6,79E+02	1,26E+03	1,57E+03	4,62E+03	6,03E+03
\bar{x} [cps]	5,68E+02	1,14E+03	2,28E+03	4,84E+03	6,50E+03
Laserspotgröße [μm]	25	50	100	200	250
SD [cps]	3,29E+02	3,11E+02	5,79E+02	6,78E+02	6,49E+02
RSD %	58	27	25	14	10

Tabelle 30 Zusammenfassung der mittels LA-ICP-MS detektierten Signale identischer Rechtecke.

Rechtecke	^{115}In Peakfläche	^{142}Nd Peakfläche	^{169}Tm Peakfläche	^{175}Lu Peakfläche
1	8,78E+07	4,53E+07	2,50E+08	4,43E+07
2	9,13E+07	4,48E+07	2,60E+08	4,53E+07
3	9,21E+07	4,40E+07	2,55E+08	4,50E+07
4	9,29E+07	4,26E+07	2,52E+08	4,46E+07
5	9,17E+07	4,36E+07	2,56E+08	4,58E+07
6	9,31E+07	4,29E+07	2,52E+08	4,57E+07
Mittelwert [counts]	9,15E+07	4,39E+07	2,54E+08	4,51E+07
RSD [counts]	1,93E+06	1,05E+06	3,60E+06	5,98E+05
relative RSD [%]	2	2	1	1

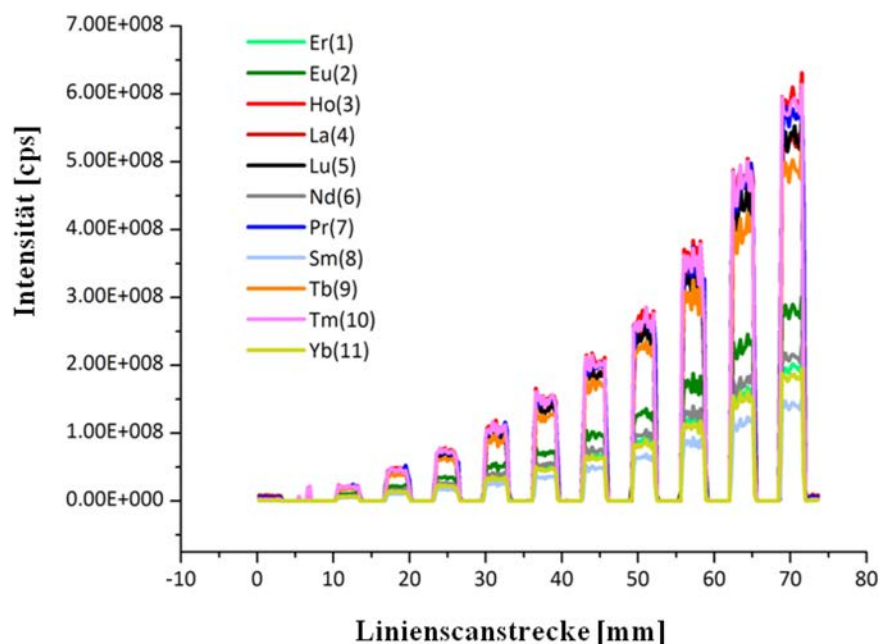
Abschnitt 3.4.2.1: Linearität des gedruckten Kalibrierstandards für die LA-ICP-MS

Abbildung 62 Zeigt die Summe der Intensitäten der Lanthansignale über die Scanlaufstrecke von gedruckten Karos mit einer Multielement-gespikten unter Verwendung unterschiedlicher Druckdichten (10-100%). In dieser Abbildung sind 11 Lanthanoide (^{166}Er , ^{153}Eu , ^{165}Ho , ^{139}La , ^{175}Lu , ^{142}Nd , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{159}Tb , ^{169}Tm , ^{174}Yb) gezeigt.

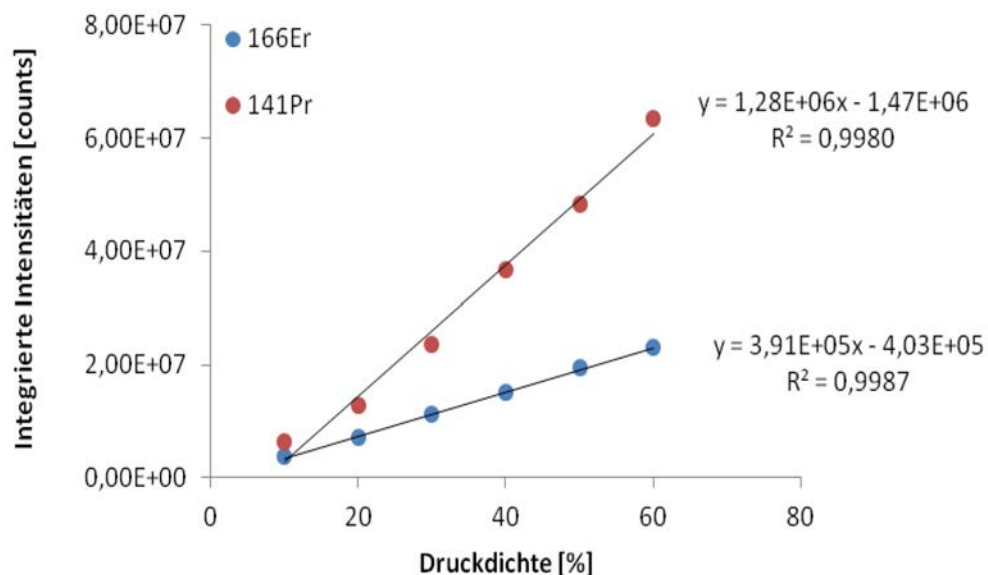


Abbildung 63 Detektierte Linearität der gedruckten Kalibrierstandards über die LA-ICP-MS. Die Abbildung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen den integrierten Peakflächen der LA-ICP-MS Daten in Abhängigkeit von der Druckdichte (^{166}Er , ^{141}Pr). Laserparameter: Laserspotgrößen: 180 μm , Laserscangeschwindigkeit 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

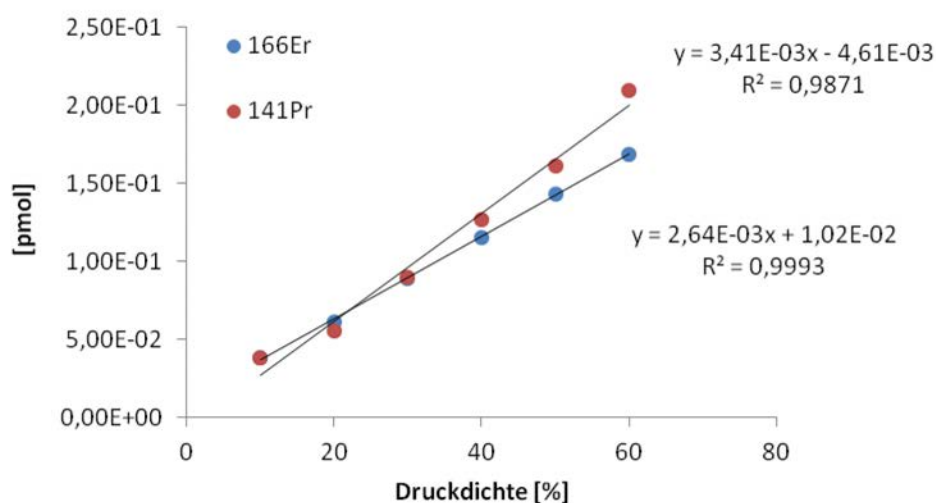


Abbildung 64 Detektierte Linearität der gedruckten Kalibrierstandards über die ICP-MS Analyse von Lösungen. Die Abbildung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Lanthanidmenge [pmol] in Abhängigkeit von der Druckdichte (¹⁶⁶Er, ¹⁴¹Pr).

Abschnitt 3.4.3.2: LA-ICP-MS Quantifizierung der MeCAT-modifizierten Proteine nach Western Blotting

Tabelle 31 Zusammenfassung der Erbium Quantifizierung in pmol via ICP-MS von 3 Metall-markierten Proteinen in Lösung.

ICP-MS	BSA	Ovalbumin	Lysozym
MeCAT	¹⁶⁶ Er	¹⁶⁶ Er	¹⁶⁶ Er
Kalibriergerade (50 mg/L Ink; Er)	$y \text{ [cps]} = 5,04\text{E}+06 \times [\text{pmol}] - 2,02\text{E}+03; R^2 = 0,9999$		
Spur 1	0,422	0,052	0,139
Spur 2	0,409	0,053	0,118
Spur 3	0,395	0,046	0,120
Spur 4	0,450	0,053	0,112
Spur 5	0,411	0,049	0,117
Mittelwert [pmool]	0,417	0,051	0,122
SD [pmol]	0,021	0,003	0,010
RSD[%]	5	6	8

Abschnitt 3.3.1: Optimierung der Probenvorbereitung

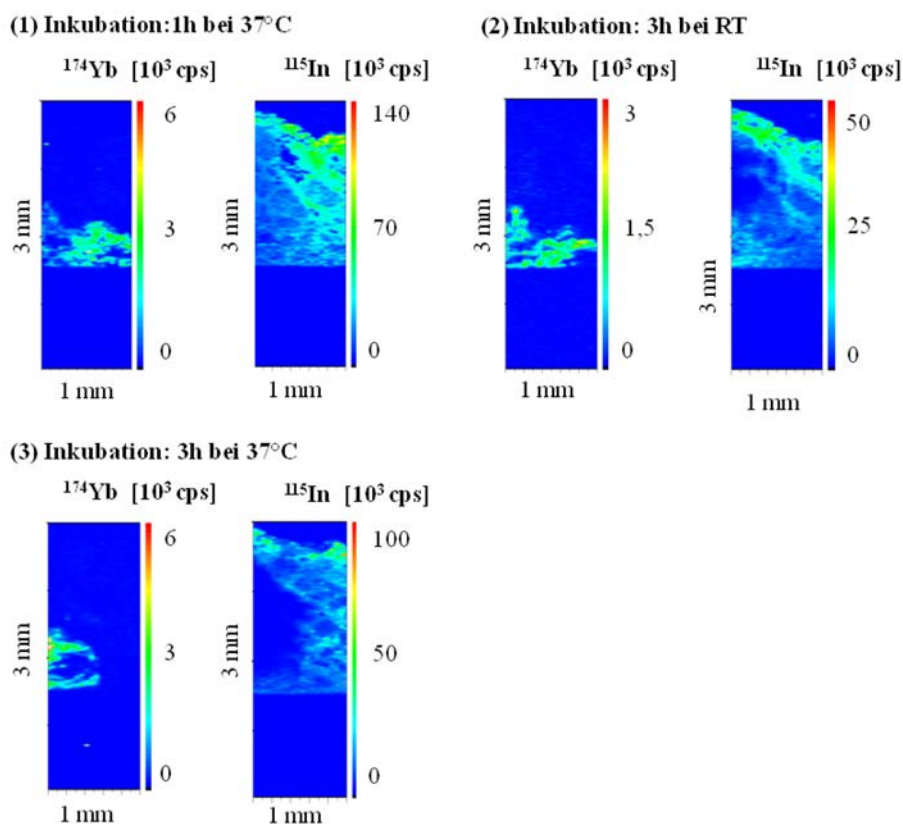


Abbildung 65 Intensitätsprofile zur Optimierung der Signalintensitäten durch Variierung der Inkubationszeiten des modifizierten anti-Her2-Antikörper an einem 5 µm dünnem Paraffin-eingebetteten Brustgewebes mit einer Auflösung von 40 µm. (1) Inkubation: 1h bei 37°C; (2) 3h bei Raumtemperatur; (3) 3h bei 37°C. Das untere Drittel der Intensitätsprofile zeigt den Gasblank der jeweiligen Messung.

Abschnitt 3.6.2: IHC-Färbung an TMA-Gewebeschnitten mit klinisch-relevanten Antikörpern

Tabelle 32 Tabellarische Zusammenfassung der visuellen Zuordnung Gradierung für die vier IHC gefärbten TMA-Gewebeschnitte der Bereiche A1-3.

Position im TMA	ERG	AMACR	PSMA	Androgenrezeptor
A 1a	1	0	1	0
A 1b	2	1	1	1
A 1c	1	1	0	1
A 1d	2	0	1	2
A 1e	2	0	1	2
A 1f	2	0	1	1
A 1g	2	0	3	1
A 1h	2	0	3	1
A 1i	3	1	3	1
A 1k	2	1	3	2
A 1l	3	1	3	0
A 1m	2	0	3	2
A 1n	3	0	3	0
A 1o	1	0	3	2
A 2a	2	1	1	2
A 2b	1	1	1	2
A 2c	1	0	0	0
A 2d	1	3	3	1
A 2e	2	0	1	0
A 2f	1	3	3	3
A 2g	1	1	3	2
A 2h	2	1	3	2
A 2i	3	1	3	1
A 2k	2	0	3	2
A 2l	2	1	3	2
A 2m	2	0	3	0
A 2n	1	1	3	1
A 2o	3	1	2	2
A 3a	1	1	1	0
A 3b	3	2	1	1
A 3c	1	0	2	0
A 3d	1	3	3	2
A 3e	1	0	2	0
A 3f	2			1
A 3g	3	1	3	1
A 3h	2	3	3	1
A 3i	1	3	3	0
A 3k	2	1	3	2
A 3l	2	3	3	2
A 3m	2	1	3	0
A 3n	2	2	3	1
A 3o	2	2	3	0

Tabelle 33 Tabellarische Zusammenfassung der visuellen Zuordnung Gradierung für die vier IHC gefärbten TMA-Gewebeschnitte der Bereiche A4-6.

Position im TMA	ERG	AMACR	PSMA	Androgenrezeptor
A 4a	2	2	1	0
A 4b	3	3	1	1
A 4c	1	2	3	1
A 4d	3	3	3	0
A 4e	2	3	3	0
A 4f	2			3
A 4g	2	3	3	0
A 4h	3	3	3	1
A 4i	2	2	3	2
A 4k	0		3	
A 4l	0	0	2	0
A 4m	2	3	3	2
A 4n	2	3	3	1
A 4o	1		3	
A 5a	2	3	2	0
A 5b	2			
A 5c	2	3	3	2
A 5d	1	2	2	1
A 5e	2	2	3	0
A 5f	2	3	3	2
A 5g	2	2	3	1
A 5h	2	1	3	2
A 5i	2	2	3	2
A 5k	1	1	3	1
A 5l	3	2	3	0
A 5m	2	3	3	2
A 5n	2	2	3	1
A 5o	2	2	3	1
A 6a	3	1	3	0
A 6b	3	2	3	0
A 6c	2	1	3	1
A 6d	1	0	3	2
A 6e	2	0	2	1
A 6f	3	1	3	0
A 6g	3	1	3	2
A 6h	1	1	3	2
A 6i	2	2	3	2
A 6k	2	1	3	1
A 6l	2	1	3	1
A 6m	2	2	3	1
A 6n	2	3	3	3
A 6o	2	2	3	2

Tabelle 34 Tabellarische Zusammenfassung der visuellen Zuordnung Gradierung für die vier IHC gefärbten TMA-Gewebeschnitte der Bereiche A7-8 und B1-2.

Position im TMA	ERG	AMACR	PSMA	Androgenrezeptor
A 7a	1			
A 7b	3	1	3	1
A 7c	3	0	2	0
A 7d	2	0	3	1
A 7e	1	0	2	1
A 7f	2	1	3	2
A 7g	3	1	2	2
A 7h	3	1	3	2
A 7i	3	0	3	0
A 7k	2	2	3	1
A 7l	2	0	3	2
A 7m	2	3	3	2
A 7n	3	0	2	1
A 7o	3	1	3	1
A 8a	2	3	3	2
A 8b	3	3	3	0
B 1a		0	3	0
B 1b	3	1	3	0
B 1c	2	1	3	1
B 1d	2	0	3	2
B 1e	3	1	3	2
B 1f	3	2	3	1
B 1g	3	0	3	1
B 1h	3	0	3	1
B 1i	3	0	2	1
B 1k	3	0	2	1
B 1l	2	0	2	1
B 1m	3	0	1	1
B 1n	3	0	1	1
B 1o	3	0	2	2
B 2a	2	2	3	1
B 2b		2	3	0
B 2c	2	0	3	1
B 2d		0	3	2
B 2e	3	0	3	1
B 2f	3	1	3	0

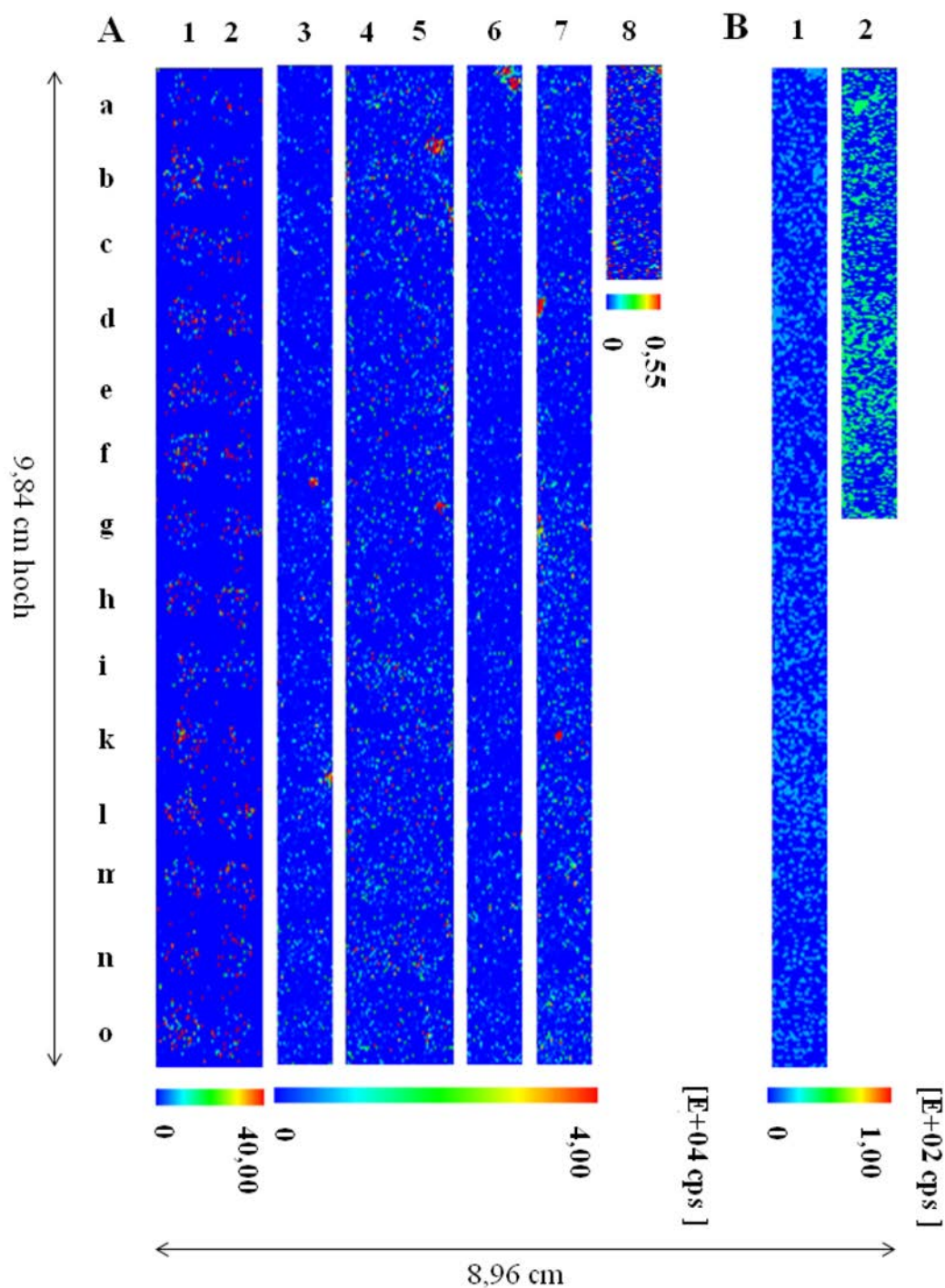
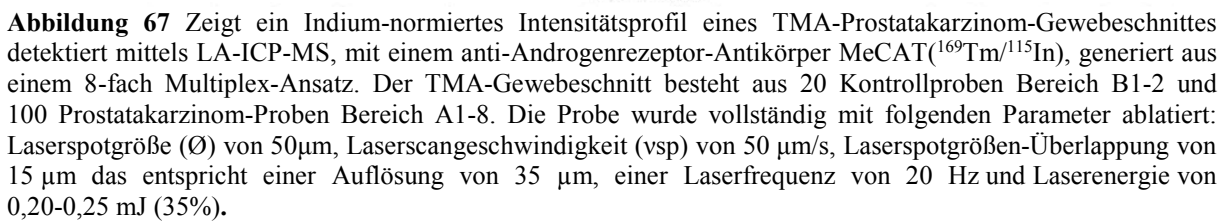
Abschnitt 3.6.3: Vergleich des 8-fach Multiplex-Assay**Anti-Erg Antikörper MeCAT(Eu/In)**

Abbildung 66 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-Erg1/2/3-Antikörper MeCAT($^{153}\text{Eu}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m}/\text{s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).



Anti-PSMA Antikörper MeCAT(Lu/In)

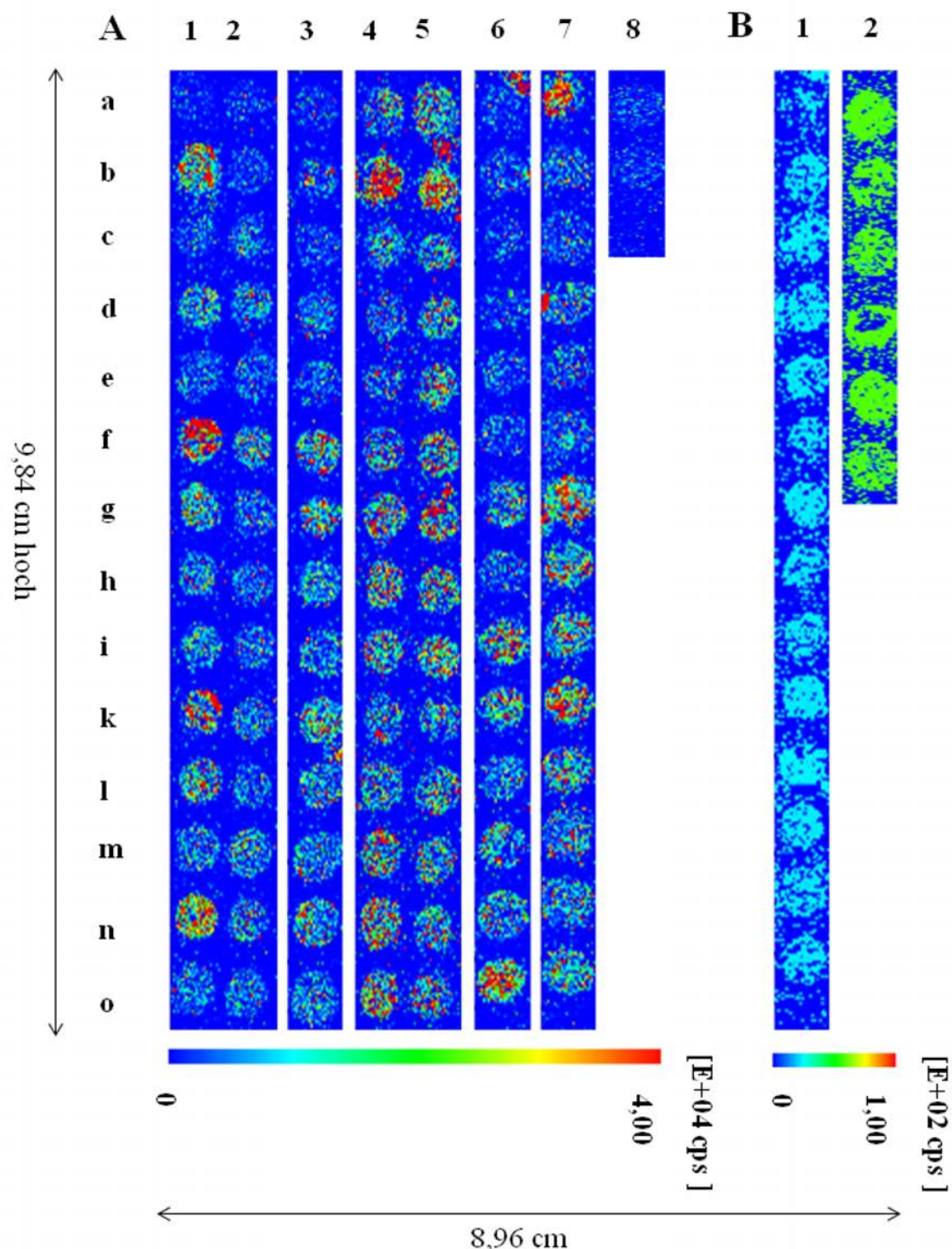


Abbildung 68 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-PSMA-Antikörper MeCAT($^{175}\text{Lu}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert Laserspotgröße (\varnothing) von 40 μm , Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m}/\text{s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Anti-AMAC Antikörper MeCAT(Pr/In)

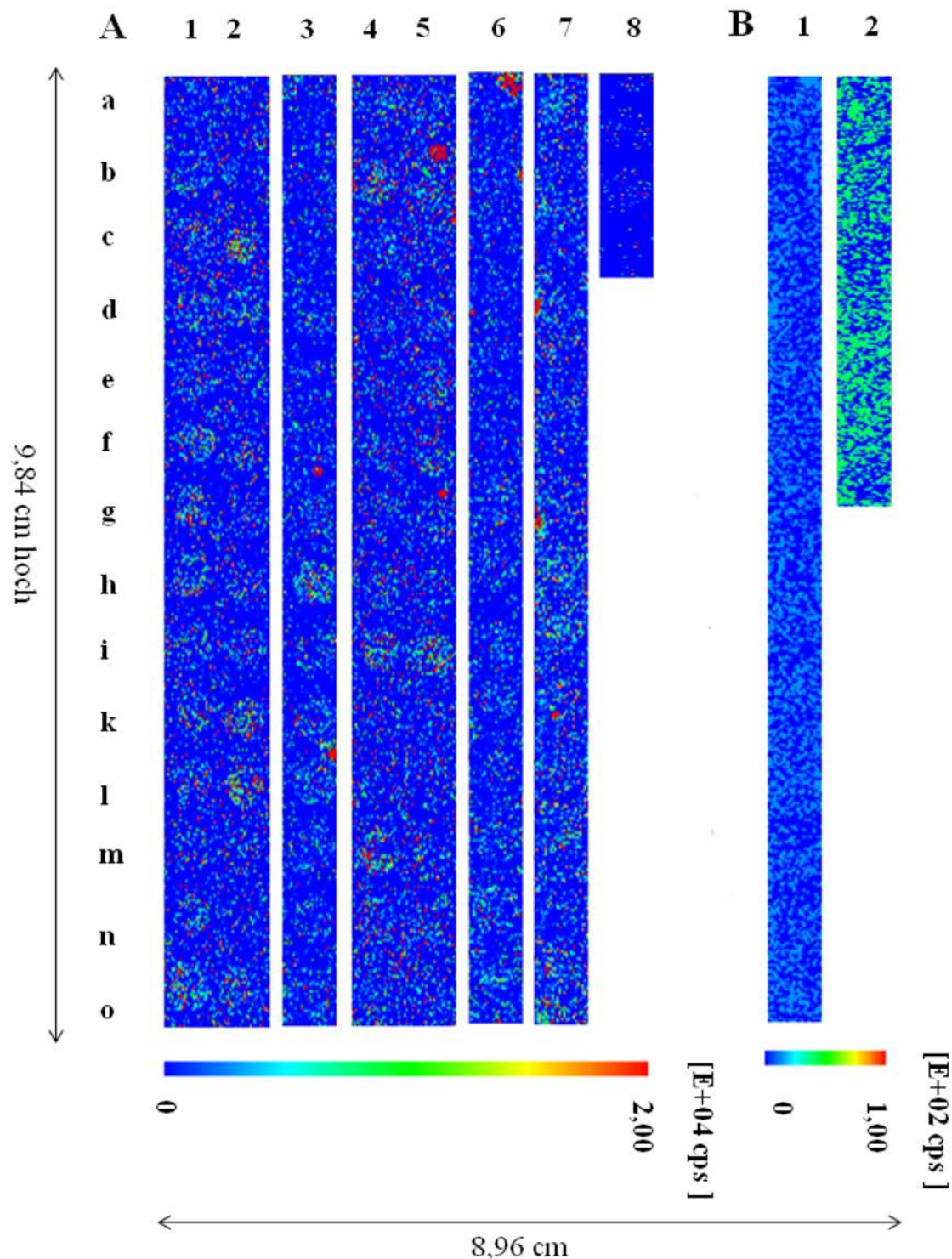


Abbildung 69 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-AMACR-Antikörper MeCAT($^{141}\text{Pr}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m}/\text{s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Tabelle 35 Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für den Multiplex-TMA-Gewebeschnitt des Bereiches A1-3.

Position im TMA	ERG (Eu/In)	AMACR (Pr/In)	PSMA (Lu/In)	Androgen. (Tm/In)	MUC1 (Tb/In)	Her2 (Yb/In)	Aktin (Nd/In)	GAPDH (Er/In)
A 1a	2,70E+08	1,60E+06	2,10E+06	1,20E+06	2,00E+05	1,56E+05	7,01E+06	7,43E+05
A 1b	5,60E+07	2,21E+06	4,85E+07	2,15E+06	3,51E+05	1,68E+05	6,88E+06	7,31E+05
A 1c	5,37E+07	2,52E+06	4,77E+06	1,00E+06	3,83E+05	1,83E+05	6,03E+06	5,07E+05
A 1d	5,78E+07	2,05E+06	1,01E+07	1,76E+06	1,60E+06	2,67E+05	8,42E+06	6,67E+05
A 1e	5,06E+07	2,16E+06	5,61E+06	1,50E+06	5,23E+05	2,28E+05	1,13E+07	6,46E+05
A 1f	6,66E+07	2,40E+06	7,60E+07	1,87E+06	5,61E+05	3,18E+05	6,70E+06	8,78E+05
A 1g	5,33E+07	2,71E+06	1,77E+07	1,29E+06	2,03E+05	1,70E+05	8,00E+06	5,08E+05
A 1h	5,02E+07	2,21E+06	7,34E+06	1,57E+06	2,00E+06	1,53E+05	1,12E+07	5,24E+05
A 1i	5,60E+07	1,53E+06	8,10E+06	1,20E+06	9,27E+05	1,47E+05	6,56E+06	5,34E+05
A 1k	1,50E+08	2,22E+06	4,27E+07	1,75E+06	2,19E+06	2,21E+05	1,30E+07	1,78E+06
A 1l	6,64E+07	1,95E+06	1,87E+07	1,65E+06	5,11E+05	2,27E+05	1,77E+07	6,93E+05
A 1m	3,20E+08	1,95E+06	7,79E+06	1,20E+06	4,63E+05	1,15E+05	1,00E+07	4,36E+06
A 1n	3,56E+07	1,82E+06	3,67E+07	1,64E+06	3,65E+05	2,74E+05	3,83E+06	4,43E+05
A 1o	6,55E+07	3,58E+06	7,17E+06	1,64E+06	6,19E+06	2,28E+05	1,51E+07	6,99E+05
A 2a	4,37E+07	1,32E+06	4,00E+06	8,55E+05	3,52E+05	1,21E+05	1,08E+06	3,74E+05
A 2b	3,10E+07	3,75E+06	3,60E+06	1,27E+06	1,97E+05	9,76E+04	1,75E+06	3,50E+05
A 2c	1,22E+08	4,06E+06	6,64E+06	1,73E+06	2,56E+06	2,33E+05	5,74E+06	1,19E+06
A 2d	5,80E+07	2,44E+06	9,00E+06	1,93E+06	5,08E+05	2,33E+05	8,64E+06	5,80E+05
A 2e	6,99E+07	1,99E+06	6,05E+06	2,42E+06	2,52E+05	2,87E+05	6,00E+06	7,46E+05
A 2f	2,87E+07	1,66E+06	1,09E+07	1,69E+06	2,01E+05	1,20E+05	5,51E+06	3,22E+05
A 2g	6,03E+07	1,64E+06	6,33E+06	1,64E+06	7,75E+05	1,79E+05	8,51E+06	5,98E+05
A 2h	3,71E+07	1,52E+06	5,90E+06	1,66E+06	2,22E+05	1,81E+05	5,47E+06	4,31E+05
A 2i	4,36E+07	1,46E+06	7,80E+06	1,40E+06	1,17E+05	1,82E+05	4,03E+06	4,20E+05
A 2k	2,78E+07	3,50E+06	6,49E+06	1,46E+06	3,00E+05	1,06E+05	9,33E+06	3,02E+05
A 2l	7,00E+07	3,98E+06	5,14E+06	1,53E+06	3,08E+05	3,70E+05	4,01E+06	5,81E+05
A 2m	4,59E+07	1,81E+06	1,18E+07	1,93E+06	2,82E+05	1,11E+05	9,52E+06	4,94E+05
A 2n	5,17E+07	9,67E+05	1,51E+07	1,55E+06	3,05E+05	2,64E+05	6,51E+06	5,14E+05
A 2o	1,38E+08	2,90E+06	7,00E+06	1,84E+06	3,28E+05	1,38E+05	1,03E+07	1,38E+06
A 3a	2,43E+05	8,23E+05	1,76E+06	3,99E+05	1,27E+05	2,63E+04	1,05E+06	4,45E+05
A 3b	5,01E+05	9,13E+05	4,16E+06	4,85E+05	4,60E+04	4,71E+04	9,05E+05	2,21E+05
A 3c	5,49E+05	9,22E+05	1,84E+06	4,77E+05	9,54E+05	8,81E+04	7,58E+05	2,30E+05
A 3d	6,03E+05	1,22E+06	4,62E+06	5,90E+05	2,28E+05	5,50E+04	2,30E+06	4,04E+05
A 3e	6,15E+05	9,92E+05	2,40E+06	6,81E+05	4,90E+05	9,79E+04	2,11E+06	2,62E+05
A 3f	1,94E+06	3,53E+06	1,26E+07	3,52E+06	2,63E+06	1,05E+06	3,31E+06	1,05E+06
A 3g	7,26E+05	1,25E+06	7,00E+06	8,01E+05	1,67E+05	5,76E+04	2,03E+06	2,57E+05
A 3h	7,79E+05	2,18E+06	5,72E+06	8,97E+05	2,56E+05	1,99E+05	4,91E+06	4,63E+05
A 3i	9,50E+05	1,21E+06	4,63E+06	5,85E+05	1,84E+05	1,51E+05	7,10E+06	2,96E+05
A 3k	1,02E+06	3,71E+06	1,13E+07	1,28E+06	3,42E+05	2,03E+05	5,65E+06	6,25E+05
A 3l	1,90E+06	3,36E+06	7,03E+06	3,05E+06	2,41E+06	7,89E+05	6,97E+06	1,09E+06
A 3m	7,67E+05	1,39E+06	5,36E+06	1,24E+06	2,08E+05	7,85E+04	6,64E+06	4,74E+05
A 3n	1,06E+06	1,16E+06	1,05E+07	9,79E+05	3,20E+05	1,57E+05	1,23E+07	4,07E+05
A 3o	9,24E+05	2,02E+06	5,35E+06	8,37E+05	2,75E+05	1,08E+05	5,47E+06	9,22E+05

Tabelle 36 Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für den Multiplex-TMA-Gewebeschnitt des Bereiches A4-6.

Position im TMA	ERG (Eu/In)	AMACR (Pr/In)	PSMA (Lu/In)	Androgen. (Tm/In)	MUC1 (Tb/In)	Her2 (Yb/In)	Aktin (Nd/In)	GAPDH (Er/In)
A 4b	1,64E+06	3,88E+06	3,09E+07	2,60E+06	3,04E+05	2,50E+05	6,61E+06	7,33E+05
A 4c	6,81E+05	1,61E+06	6,43E+06	8,74E+05	5,55E+05	1,64E+05	4,45E+06	4,18E+05
A 4d	6,65E+05	1,49E+06	4,52E+06	7,92E+05	1,04E+06	1,04E+05	1,12E+06	6,54E+05
A 4e	7,62E+05	1,19E+06	3,70E+06	3,69E+05	1,22E+05	1,68E+05	3,75E+06	4,30E+05
A 4f	1,04E+06	2,30E+06	7,89E+06	6,62E+05	2,17E+05	1,80E+05	3,87E+06	4,39E+05
A 4g	9,31E+05	1,73E+06	1,30E+07	1,34E+06	2,84E+05	1,90E+05	1,24E+07	7,87E+05
A 4h	1,20E+06	1,86E+06	1,20E+07	1,55E+06	3,91E+05	1,50E+05	1,67E+07	6,07E+05
A 4i	1,43E+06	3,34E+06	8,46E+06	1,92E+06	7,67E+05	1,23E+05	1,17E+07	7,94E+05
A 4k	9,50E+05	1,71E+06	1,05E+07	1,05E+06	3,74E+05	1,19E+05	2,79E+06	6,47E+05
A 4l	1,49E+06	2,25E+06	8,22E+06	1,97E+06	6,52E+05	2,78E+05	1,33E+07	8,68E+05
A 4m	1,47E+06	4,03E+06	1,63E+07	1,99E+06	2,87E+05	2,92E+05	1,16E+07	7,93E+05
A 4n	1,87E+06	2,71E+06	1,69E+07	1,58E+06	1,19E+06	2,05E+05	1,46E+07	1,55E+06
A 4o	1,24E+06	2,17E+06	1,61E+07	1,55E+06	4,99E+05	1,26E+05	8,09E+06	5,44E+05
A 5a	7,88E+06	1,40E+07	2,40E+07	1,44E+07	1,10E+07	4,46E+06	1,69E+07	4,72E+06
A 5b	1,86E+06	3,57E+06	2,03E+07	3,70E+06	9,68E+05	7,81E+05	4,83E+06	9,53E+05
A 5c	6,79E+05	1,42E+06	6,08E+06	9,46E+05	1,54E+05	1,62E+05	2,31E+06	3,50E+05
A 5d	1,30E+06	1,62E+06	8,82E+06	1,24E+06	3,32E+05	1,05E+05	3,54E+06	3,92E+05
A 5e	1,37E+06	2,27E+06	8,67E+06	1,78E+06	4,31E+05	1,07E+05	1,56E+07	5,95E+05
A 5f	1,13E+06	2,92E+06	1,20E+07	2,13E+06	1,46E+08	1,71E+05	7,72E+06	1,21E+06
A 5g	4,09E+06	7,11E+06	2,56E+07	6,36E+06	5,25E+06	1,88E+06	3,77E+06	2,32E+06
A 5h	1,00E+06	1,69E+06	1,09E+07	1,26E+06	2,21E+05	1,37E+05	7,68E+06	7,37E+05
A 5i	1,25E+06	3,44E+06	1,11E+07	2,28E+06	2,41E+05	1,79E+05	5,86E+06	8,04E+05
A 5k	1,40E+06	1,82E+06	6,11E+06	7,08E+05	3,19E+05	1,45E+05	1,31E+06	5,51E+05
A 5l	1,48E+06	2,25E+06	9,11E+06	1,32E+06	3,86E+05	6,75E+04	2,12E+06	4,12E+05
A 5m	1,34E+06	2,74E+06	7,92E+06	1,53E+06	1,60E+06	1,88E+05	1,96E+07	1,30E+06
A 5n	1,58E+06	2,74E+06	9,82E+06	1,76E+06	6,68E+05	1,33E+05	1,33E+07	1,11E+06
A 5o	1,55E+06	2,19E+06	9,60E+06	1,42E+06	4,22E+05	1,48E+05	6,63E+06	7,61E+05
A 6a	5,38E+06	9,48E+06	1,07E+07	9,73E+06	8,30E+06	3,19E+06	2,38E+06	3,38E+06
A 6b	1,60E+06	3,57E+06	4,61E+06	2,85E+06	1,87E+06	8,51E+05	1,69E+06	1,11E+06
A 6c	7,93E+05	1,27E+06	1,72E+06	4,71E+05	5,95E+04	1,31E+05	1,02E+06	6,89E+05
A 6d	5,08E+05	1,87E+06	1,75E+06	2,70E+05	1,53E+05	1,10E+05	1,36E+06	7,87E+05
A 6e	4,55E+05	6,75E+05	2,60E+06	9,62E+05	3,07E+05	7,03E+04	1,43E+06	1,25E+05
A 6f	5,66E+05	8,22E+05	2,99E+06	5,09E+05	1,14E+05	1,23E+05	1,99E+06	2,59E+05
A 6g	8,87E+05	1,66E+06	5,93E+06	9,35E+05	1,77E+06	1,02E+05	2,78E+06	3,79E+05
A 6h	5,42E+05	1,20E+06	2,64E+06	4,09E+05	7,24E+04	8,29E+04	1,35E+06	5,34E+05
A 6i	8,03E+05	1,53E+06	1,20E+07	7,47E+05	2,32E+05	1,42E+05	5,10E+06	3,45E+05
A 6k	6,91E+05	1,17E+06	7,32E+06	1,02E+06	1,08E+05	1,19E+05	2,87E+06	3,59E+05
A 6l	6,69E+05	1,40E+06	4,21E+06	1,16E+06	3,60E+05	1,53E+05	4,62E+06	3,56E+05
A 6m	7,06E+05	1,41E+06	6,17E+06	5,48E+05	1,17E+05	9,70E+04	2,29E+06	9,48E+05
A 6n	8,69E+05	2,17E+06	7,61E+06	1,16E+06	6,50E+05	8,40E+04	9,41E+06	7,60E+05
A 6o	7,52E+05	1,38E+06	1,67E+07	7,90E+05	1,32E+05	1,83E+05	2,85E+06	3,00E+05

Tabelle 37 Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für den Multiplex-TMA-Gewebeschnitt des Bereiches A1-3.

Position im TMA	ERG (Eu/In)	AMACR (Pr/In)	PSMA (Lu/In)	Androgen. (Tm/In)	MUC1 (Tb/In)	Her2 (Yb/In)	Aktin (Nd/In)	GAPDH (Er/In)
A 7a	1,43E+06	2,14E+06	2,30E+07	2,38E+06	2,80E+05	1,67E+05	6,89E+06	6,21E+05
A 7b	1,01E+06	1,67E+06	4,17E+06	7,39E+05	1,35E+05	6,54E+04	1,88E+06	3,21E+05
A 7c	8,28E+05	2,70E+06	3,37E+06	6,99E+05	1,12E+05	1,55E+05	2,03E+06	5,36E+05
A 7d	1,46E+07	1,87E+07	3,21E+07	3,15E+07	2,20E+07	1,10E+07	5,95E+06	9,82E+06
A 7e	8,57E+05	1,87E+06	3,32E+06	7,07E+05	1,63E+05	4,56E+04	2,87E+06	4,21E+05
A 7f	7,41E+05	1,70E+06	4,29E+06	6,88E+05	1,95E+05	2,07E+05	1,46E+06	5,41E+05
A 7g	2,39E+06	3,56E+06	2,75E+07	4,26E+06	2,13E+06	1,18E+06	1,06E+07	1,58E+06
A 7h	1,65E+06	2,22E+06	1,30E+07	1,46E+06	3,81E+05	1,80E+05	1,48E+07	8,00E+05
A 7i	1,43E+06	2,84E+06	1,04E+07	1,52E+06	2,82E+05	2,87E+05	6,02E+06	6,42E+05
A 7k	5,71E+06	9,85E+06	2,66E+07	1,06E+07	7,53E+06	3,19E+06	7,43E+06	3,44E+06
A 7l	1,43E+06	2,20E+06	1,06E+07	1,84E+06	3,30E+06	2,09E+05	9,84E+06	1,02E+06
A 7m	1,57E+06	2,65E+06	8,15E+06	1,37E+06	6,47E+05	2,28E+05	1,18E+07	2,27E+06
A 7n	1,23E+06	1,65E+06	1,20E+07	1,07E+06	2,79E+05	8,63E+04	8,94E+06	7,28E+05
A 7o	1,86E+06	2,87E+06	8,48E+06	2,01E+06	6,61E+05	2,49E+05	2,80E+07	8,72E+05
A 8a	4,26E+05	7,88E+05	1,94E+06	4,87E+05	4,36E+06	4,78E+04	1,09E+06	1,11E+05
A 8b	4,13E+05	5,63E+05	1,32E+06	5,46E+05	3,71E+05	2,12E+04	1,18E+06	1,17E+05
B 1a	3,68E+05	6,67E+05	1,16E+06	5,30E+05	4,57E+05	4,72E+04	4,84E+05	3,82E+04
B 1b	8,76E+05	6,74E+05	7,40E+05	6,54E+05	4,87E+06	2,23E+06	2,60E+06	2,01E+06
B 1c	6,80E+05	9,40E+05	2,42E+06	6,46E+05	1,28E+05	5,51E+04	3,76E+06	1,91E+05
B 1d	7,95E+05	5,44E+05	3,47E+06	6,04E+05	2,64E+05	2,12E+05	2,40E+06	4,85E+05
B 1e	5,56E+05	7,23E+05	2,49E+06	6,25E+05	6,15E+04	1,33E+05	1,91E+06	1,93E+05
B 1f	6,19E+05	4,97E+05	1,18E+06	3,05E+05	1,87E+05	8,80E+04	1,35E+06	1,69E+05
B 1g	8,12E+05	8,02E+05	3,50E+06	6,04E+05	8,69E+04	9,11E+04	1,75E+06	3,47E+05
B 1h	6,88E+05	6,15E+05	1,63E+06	3,69E+05	5,37E+04	1,17E+05	1,47E+06	3,23E+05
B 1i	6,65E+05	7,33E+05	2,35E+06	5,13E+05	1,25E+05	7,75E+04	1,91E+06	3,01E+05
B 1k	9,66E+05	7,71E+05	3,46E+06	9,36E+05	1,58E+05	7,10E+04	4,26E+06	2,88E+05
B 1l	8,54E+05	8,47E+05	3,30E+06	8,77E+05	2,25E+05	1,64E+05	7,36E+06	3,28E+05
B 1m	7,52E+05	4,06E+05	3,50E+06	4,26E+05	1,54E+05	1,38E+05	1,50E+06	2,01E+05
B 1n	6,12E+05	4,82E+05	6,79E+05	2,68E+05	1,17E+05	1,22E+05	1,74E+06	2,37E+05
B 1o	6,33E+05	5,32E+05	2,52E+06	3,25E+05	6,62E+04	6,68E+04	1,95E+06	3,23E+05
B 2a	7,89E+05	8,29E+05	7,07E+05	1,34E+06	3,29E+06	1,41E+06	2,06E+06	1,62E+06
B 2b	3,84E+05	9,03E+05	1,72E+06	7,54E+05	1,06E+05	7,87E+04	2,59E+06	2,45E+05
B 2c	3,44E+05	5,68E+05	2,55E+06	5,90E+05	9,60E+04	1,10E+05	1,77E+06	2,81E+05
B 2d	8,29E+05	8,67E+05	3,50E+06	1,32E+06	2,46E+05	1,84E+05	7,12E+06	3,49E+05
B 2e	7,82E+05	9,91E+05	6,54E+05	1,25E+06	1,95E+05	1,93E+05	4,51E+06	4,33E+05
B 2f	4,02E+05	7,84E+05	3,47E+06	9,10E+05	1,21E+05	4,86E+04	1,48E+06	2,52E+05

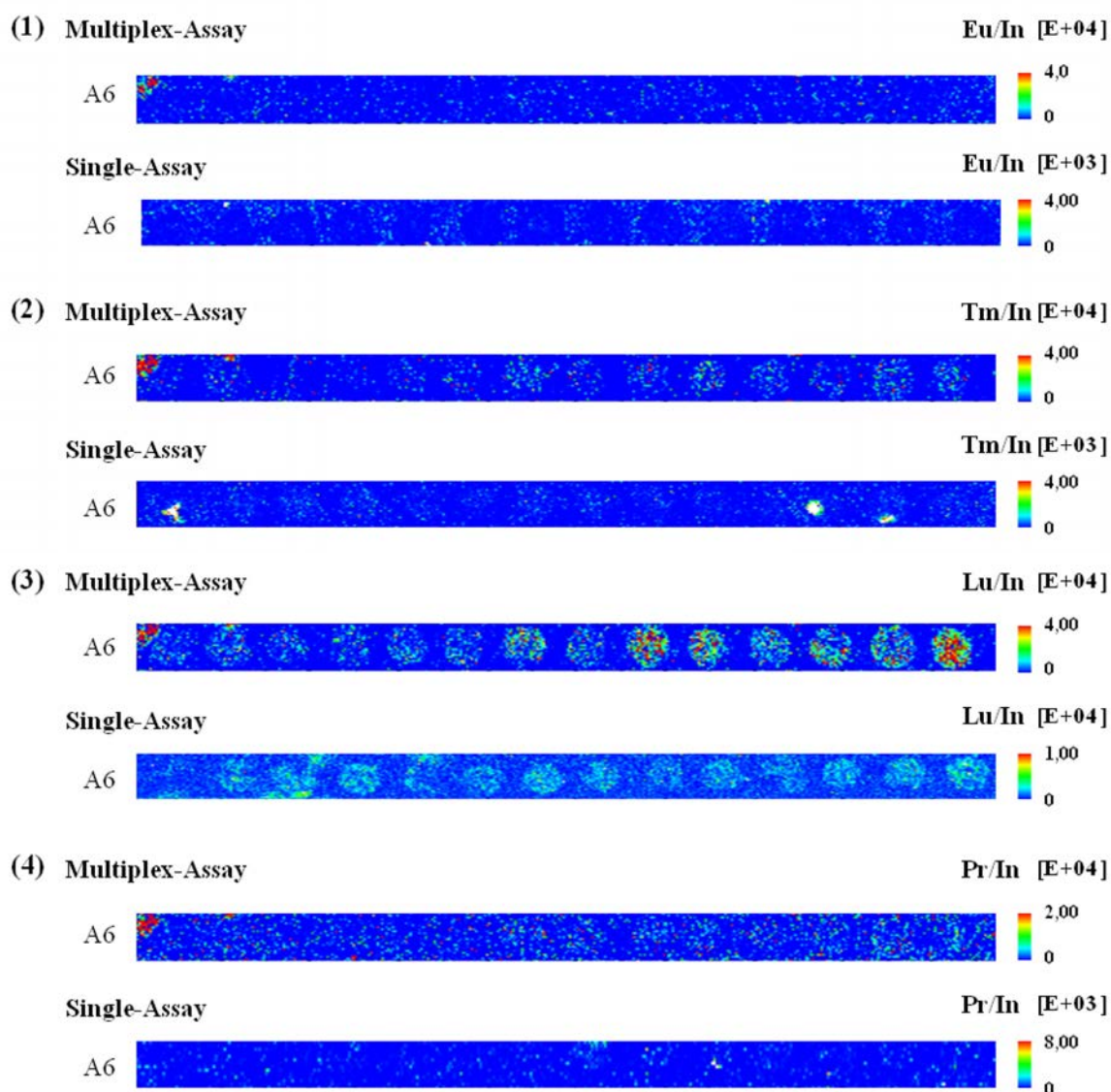


Abbildung 70 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines Multiplex-Ansatzes im direkten Vergleich zum Singleplex-Ansatz der modifizierten vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper auf vier einzelnen bzw. einem TMA-Gewebeschnitt an der Beispiel Reihe A6. Die Abbildung ist unterteilt in (1) für den anti-Erg-Antikörper MeCAT($^{153}\text{Eu}/^{115}\text{In}$), (2) für den anti-Androgenrezeptor-Antikörper MeCAT($^{169}\text{Tm}/^{115}\text{In}$), (3) für den anti-PSMA-Antikörper MeACT($^{175}\text{Lu}/^{115}\text{In}$) und (4) für den anti-AMACR-Antikörper MeACT($^{141}\text{Pr}/^{151}\text{In}$) jeweils im Multiplex-Ansatz und Single Ansatz via LA-ICP-MS detektiert. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 35 μm , Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie mit 0,20-0,25 mJ (35%).

Anti-MUC1 Antikörper MeCAT(Tb/In)

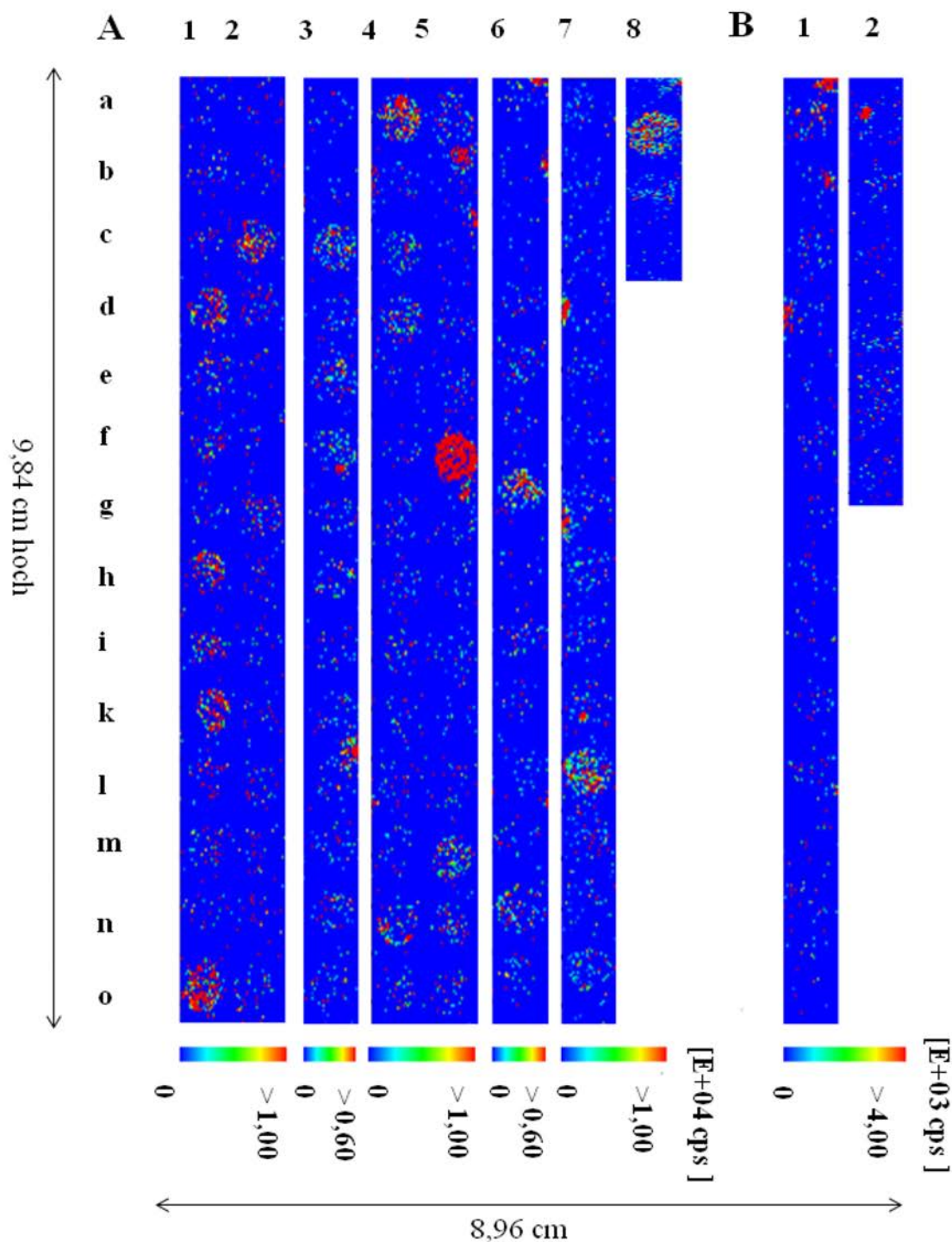


Abbildung 71 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-MUC1-Antikörper MeCAT($^{159}\text{Tb}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8 fachen Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Reihen B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Reihen A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 50 μm , Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserscangeschwindigkeit (v_{sp}) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie mit 0,20-0,25 mJ (35%).

Anti-HER2 Antikörper MeCAT(Yb/In)

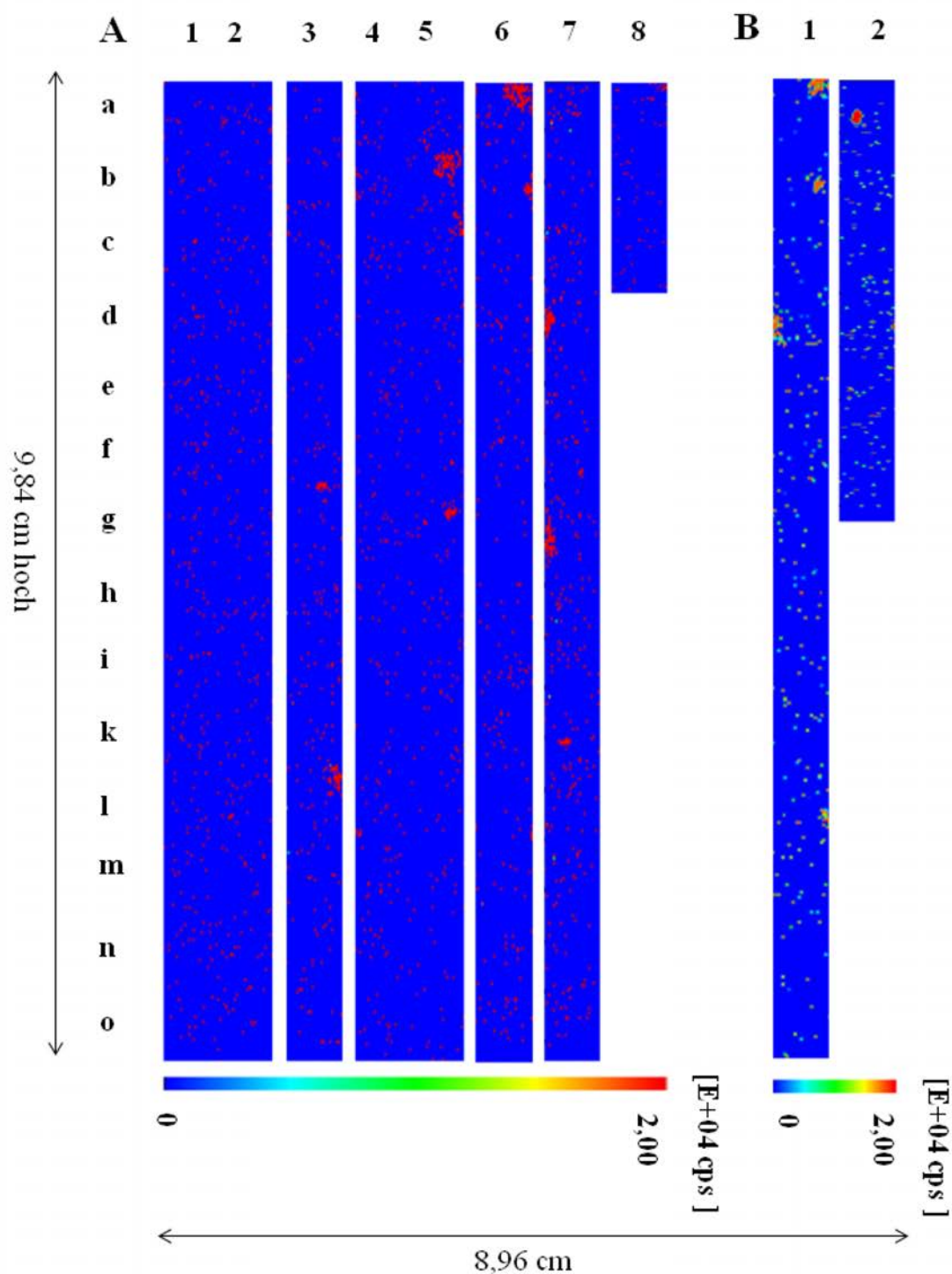


Abbildung 72 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-MUC1-Antikörper MeCAT($^{174}\text{Yb}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von $35\mu\text{m}$, Laserscangeschwindigkeit (vsp) von $50\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von $15\mu\text{m}$ das entspricht einer Auflösung von $35\mu\text{m}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von $0,20\text{-}0,25\text{ mJ}$ (35%).

Anti-Aktin Antikörper MeCAT(Nd/In)

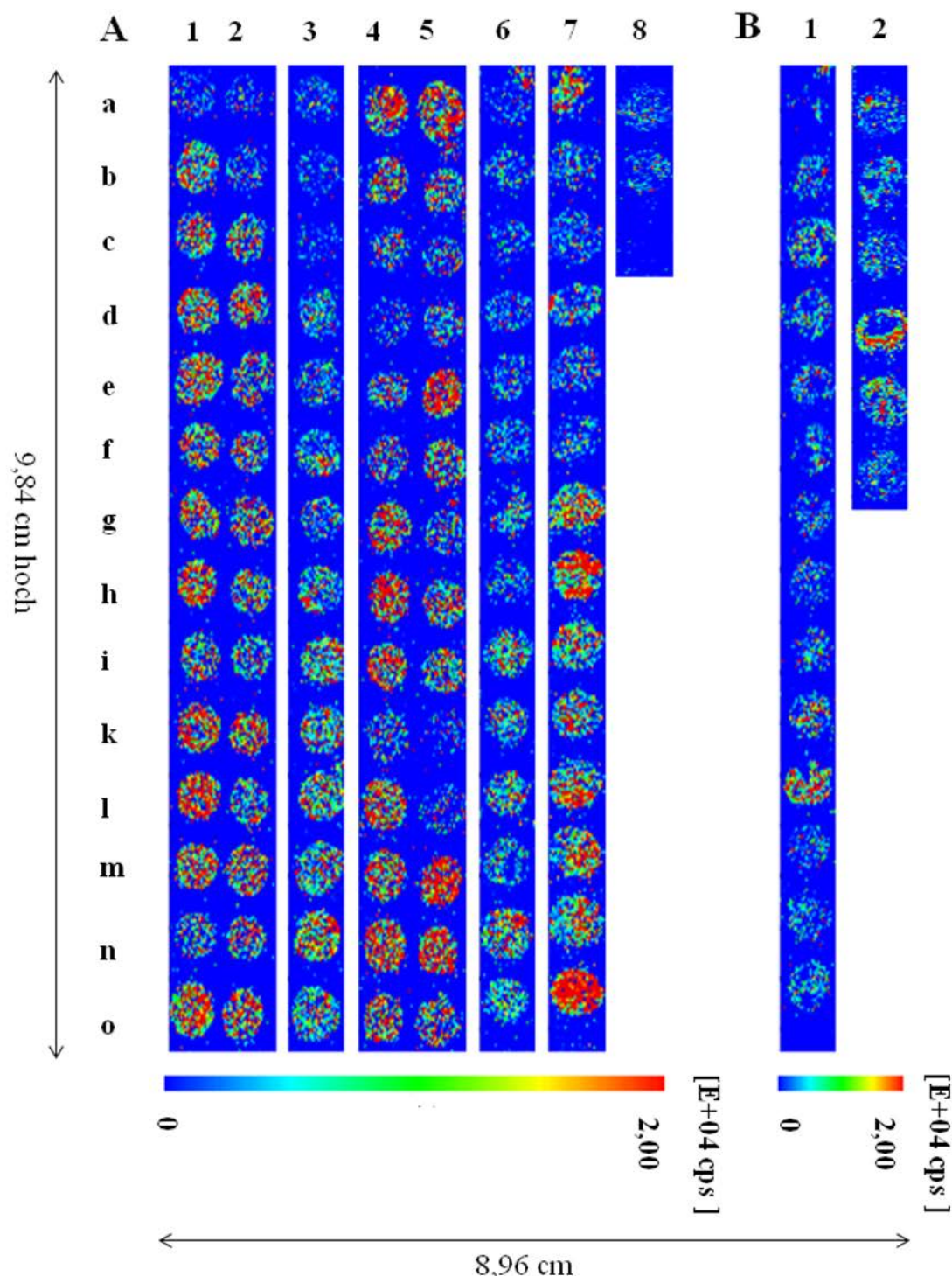


Abbildung 73 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-Aktin-Antikörper MeCAT($^{142}\text{Nd}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m}/\text{s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Anti-GAPDH Antikörper MeCAT(Er/In)

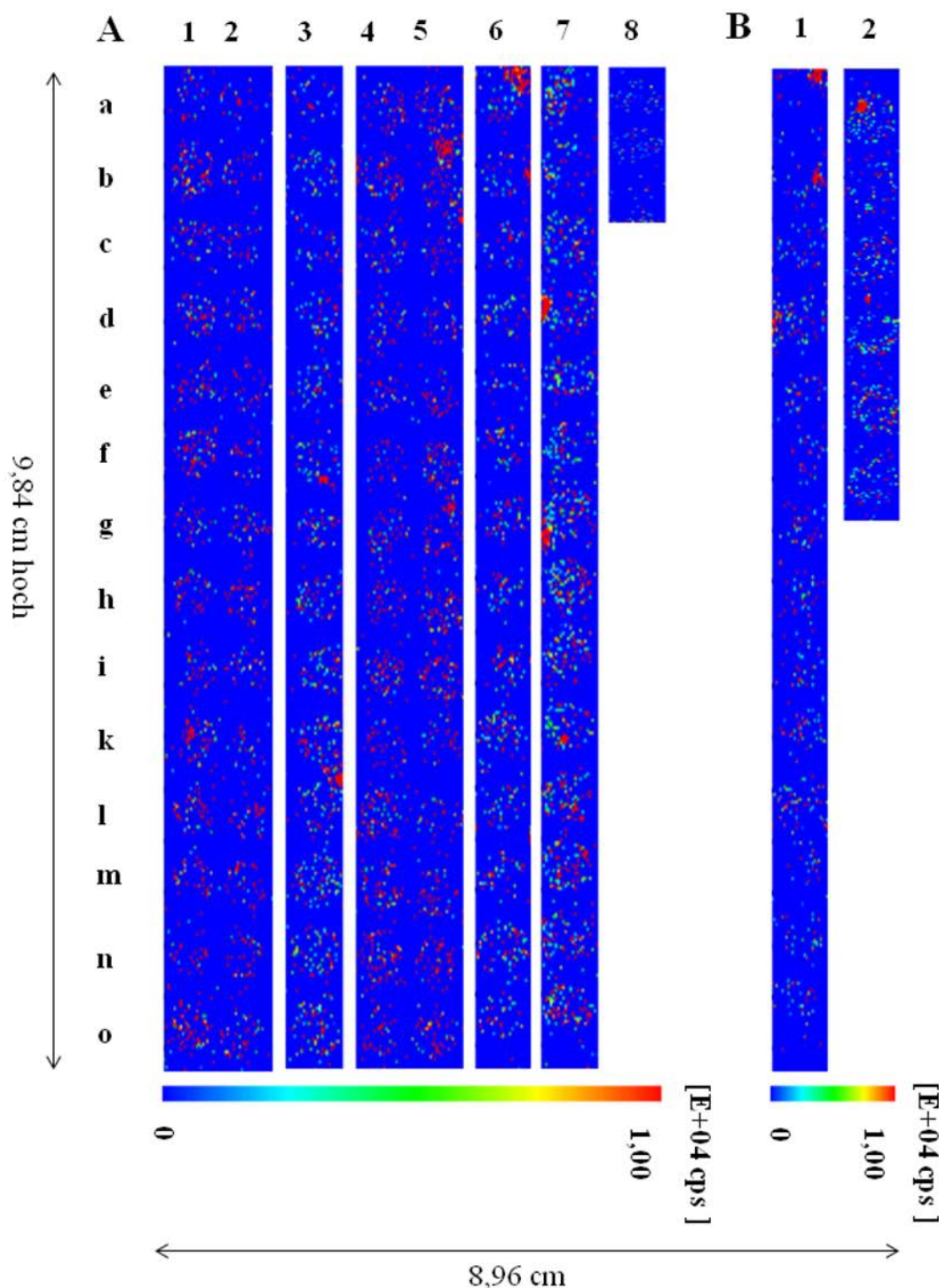


Abbildung 74 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-GAPDH-Antikörper MeCAT($^{166}\text{Er}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\varnothing) von 50 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m}/\text{s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

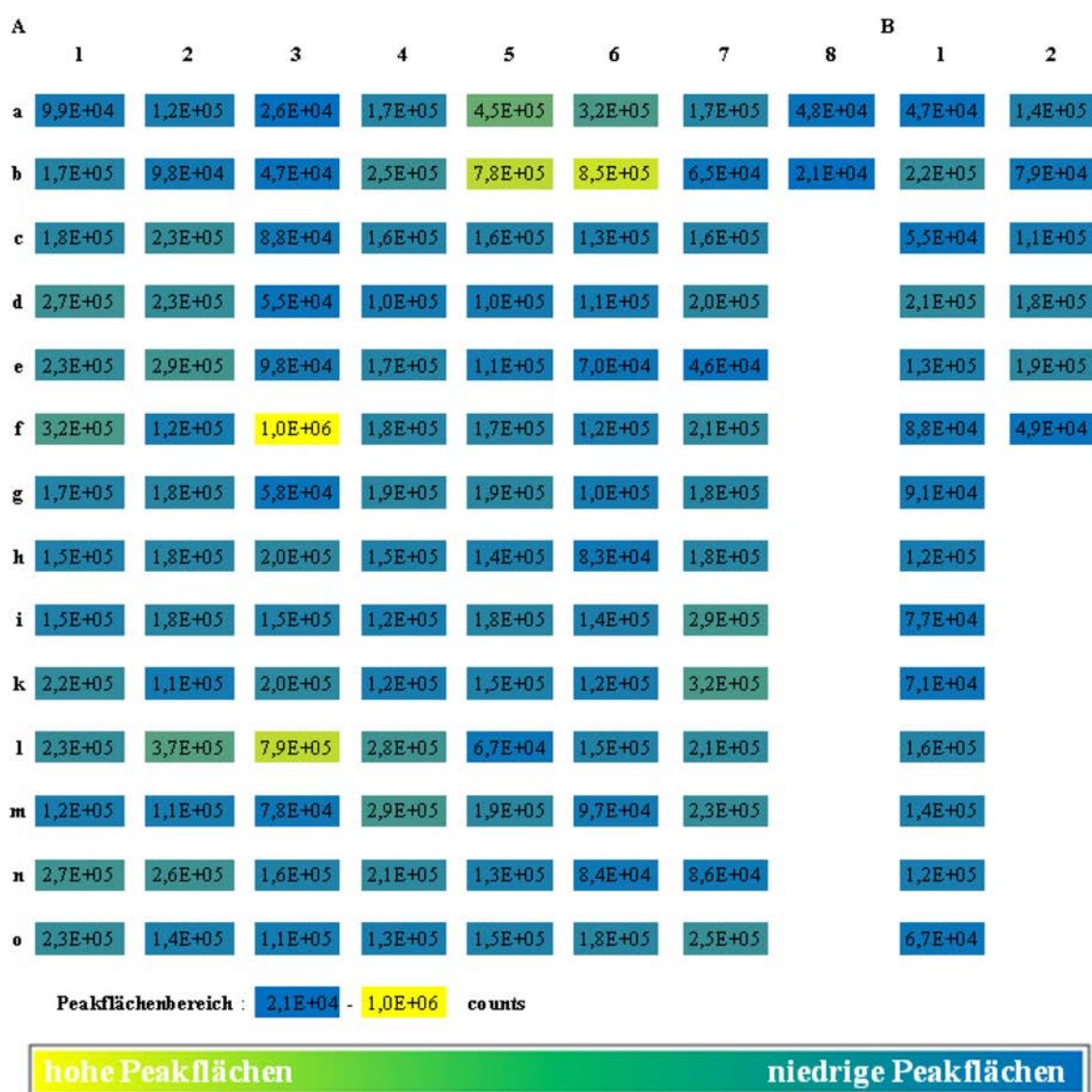


Abbildung 75 Zeigt die einzelnen LA-ICP-MS detektierten Biopsieproben des 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnittes wurden farbkodiert in einer 2-Farben-Skalar, um die Abweichung der Indium-normierten Peakflächen [counts] zu einander grafisch darzustellen. Es wurde ein anti-Her2-Antikörper eingesetzt als eine einfache oder absolute negativ-Kontrolle für alle 120 Biopsieproben. Die Ablation erfolgt unter folgenden Parametern: Laserspotgröße (Ø) von 35µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm/s, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 µm das entspricht einer Auflösung von 35 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

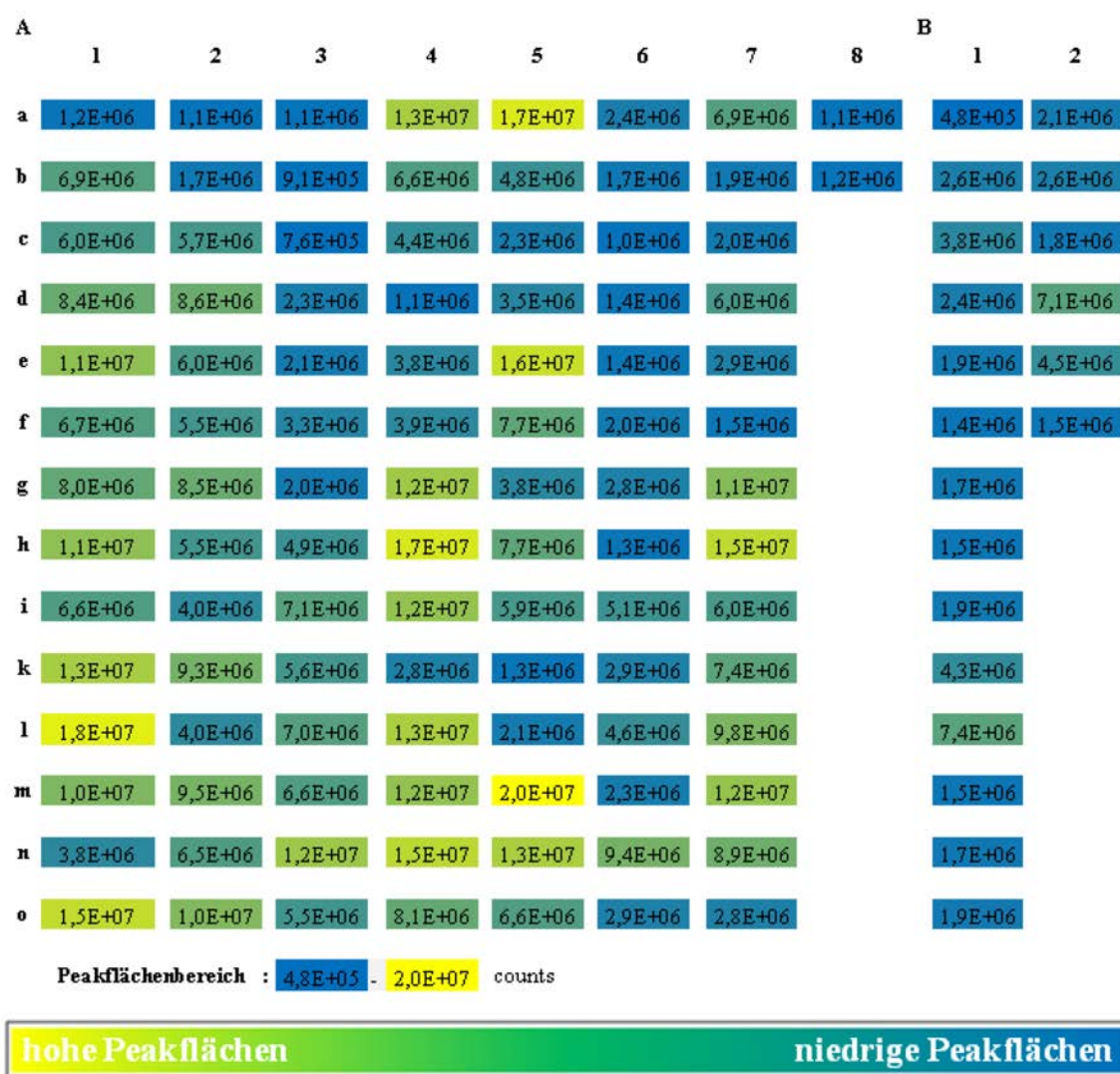


Abbildung 76 Zeigt die einzelnen LA-ICP-MS detektierten Biopsieproben des 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnittes wurden farbkodiert in einer 2-Farben-Skalar, um die Abweichung der Indium-normierten Peakflächen [counts] zu einander grafisch darzustellen. Es wurde ein anti-Aktin Antikörper eingesetzt als eine einfache oder absolute negativ-Kontrolle für alle 120 Biopsieproben. Die Ablation erfolgt unter folgenden Parametern: Laserspotgröße (Ø) von 35µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm/s, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 µm das entspricht einer Auflösung von 35 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).



Abbildung 77 Zeigt die einzelnen LA-ICP-MS detektierten Biopsieproben des 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnittes wurden farbkodiert in einer 2-Farben-Skalar, um die Abweichung der Indium-normierten Peakflächen [counts] zu einander grafisch darzustellen. Es wurde ein anti-GAPDH-Antikörper eingesetzt als eine einfache oder absolute negativ-Kontrolle für alle 120 Biopsieproben. Die Ablation erfolgt unter folgenden Parametern: Laserspotgröße (Ø) von 35µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm/s, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 µm das entspricht einer Auflösung von 35 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

Abschnitt 3.7.3: IHC-Färbung an Mausgehirngewebeschnitten mit Parkinson-spezifischen Antikörpern im Einzelnachweis

Tabelle 38 Zusammenfassung der automatisch ermittelten Peakfläche für die IHC gefärbten Proteine NeuN und GFAP der Mausgehirngewebeschnitte (ho-Typ, wt-Typ).

IHC-Färbung	NeuN			GFAP		
	Fläche	int. Intensitäten	\bar{X} Int. Intensitäten	Fläche	int. Intensitäten	\bar{X} Int. Intensitäten
ho842_oben	25,54	8,03E+05	9,54E+08	42,69	1,48E+09	1,53E+09
ho842_unten	24,27	9,54E+08		40,51	1,58E+09	
ho844_oben	29,91	8,09E+08	8,10E+08	38,80	1,42E+09	1,49E+09
ho844_unten	24,94	8,11E+08		52,84	1,56E+09	
ho846_oben	28,57	8,15E+08	1,08E+09	69,08	2,39E+09	2,20E+09
ho846_unten	44,59	1,34E+09		58,30	2,01E+09	
ho847_oben	28,24	1,05E+09	1,33E+09	64,92	2,38E+09	2,38E+09
ho847_unten	50,43	1,61E+09		66,54	2,13E+08	
ho848_oben	44,67	1,33E+09	1,24E+09	79,31	2,98E+09	2,88E+09
ho848_unten	34,00	1,14E+09		76,25	2,79E+09	
ho850_oben	21,97	7,33E+05	7,82E+08	49,32	1,81E+09	1,81E+09
ho850_unten	24,94	7,82E+08		57,81	2,11E+08	
ho851_oben	29,37	1,04E+09	1,04E+09	20,13	6,30E+08	
ho851_unten	25,84	1,04E+09		121,79	4,79E+09	
ho856_oben	24,69	9,13E+08	8,45E+08	82,20	3,06E+09	3,27E+09
ho856_unten	21,44	7,77E+08		103,53	3,48E+09	
ho897_oben	18,93	6,13E+08	5,71E+08	142,83	5,94E+09	4,06E+09
ho897_unten	17,73	5,30E+08		61,36	2,19E+09	
ho900_oben	24,52	8,00E+08	7,26E+08	134,24	5,29E+09	3,91E+09
ho900_unten	21,60	6,51E+08		67,33	2,53E+09	
Mittelwert			9,37E+08			2,62E+09
wt262_oben	52,04	1,35E+09	1,55E+09	92,68	2,24E+09	2,03E+09
wt262_unten	43,52	1,75E+09		71,48	1,82E+09	
wt263_oben	36,55	1,31E+09	1,31E+09	68,00	2,58E+09	2,01E+09
wt263_unten	63,78	2,20E+08		37,29	1,45E+09	
wt264_oben	42,10	1,79E+09	2,43E+09	46,27	1,38E+09	1,31E+09
wt264_unten	60,19	3,07E+09		30,39	1,23E+09	
wt267_oben	44,45	1,49E+09	1,81E+09	44,99	1,38E+09	1,30E+09
wt267_unten	49,77	2,12E+09		42,49	1,22E+09	
wt269_oben	43,12	1,45E+09	1,68E+09	43,48	8,27E+08	1,95E+09
wt269_unten	49,06	1,92E+09		81,34	3,07E+09	
wt270_oben	36,53	1,03E+09	1,40E+09	43,87	1,28E+09	1,11E+09
wt270_unten	48,44	1,78E+09		28,60	9,38E+08	
wt272_oben	45,69	1,23E+06	2,08E+09	45,78	1,33E+09	1,41E+09
wt272_unten	54,07	2,08E+09		49,00	1,48E+09	
wt276_oben	38,55	1,22E+09	1,41E+09	46,78	1,66E+09	1,42E+09
wt276_unten	40,,09	1,60E+09		39,98	1,18E+09	
wt279_oben	53,91	1,65E+06	1,46E+09	43,88	9,07E+08	1,48E+09
wt279_unten	42,13	1,46E+09		65,45	2,05E+09	
wt280_oben	45,85	1,98E+09	1,98E+09	35,11	1,20E+09	1,38E+09
wt280_unten	49,24	1,98E+09		42,35	1,56E+09	
Mittelwert			1,71E+09			1,54E+09

Tabelle 39 Zusammenfassung der manuellen gezählten, IHC gefärbten Zellen der Mausgehirngewebeschnitte für den ho-Typ und den wt-Typ der Proteine TH und α -synuclein.

IHC-Färbung	TH		α -synuclein	
	Anzahl der Zellen	\bar{X} Anzahl der Zellen	Anzahl der Zellen	\bar{X} Anzahl der Zellen
ho842_oben	167,00	150,50	924,00	991,5
ho842_unten	134,00		1059,00	
ho844_oben	195,00	205,50	1053,00	1025
ho844_unten	216,00		997,00	
ho846_oben	95,00	88,50	1124,00	1085,5
ho846_unten	82,00		1047,00	
ho847_oben	109,00	93,50	462,00	545
ho847_unten	78,00		628,00	
ho848_oben	74,00	62,50	1069,00	1067
ho848_unten	51,00		1065,00	
ho850_oben	108,00	104,50	759,00	743,5
ho850_unten	101,00		728,00	
ho851_oben	104,00	86,50	640,00	645,5
ho851_unten	69,00		651,00	
ho856_oben	208,00	224,50	985,00	928
ho856_unten	241,00		871,00	
ho897_oben			946,00	851,00
ho897_unten			756,00	
ho900_oben	314,00	275,50		1056
ho900_unten	237,00		1056,00	
Mittelwert		143,50		893,80
wt262_oben	94,00	92,50	0,00	0,00
wt262_unten	91,00		0,00	0,00
wt263_oben	171,00	136,00	0,00	0,00
wt263_unten	101,00		0,00	0,00
wt264_oben	99,00	83,50		
wt264_unten	68,00			
wt267_oben	166,00	120,50		
wt267_unten	75,00			
wt269_oben	246,00	198,00		
wt269_unten	150,00			
wt270_oben	256,00	192,50	0,00	0,00
wt270_unten	129,00		0,00	0,00
wt272_oben	248,00	221,00		
wt272_unten	194,00			
wt276_oben	81,00	78,50	0,00	0,00
wt276_unten	76,00		0,00	0,00
wt279_oben	194,00	170,50	0,00	0,00
wt279_unten	147,00		0,00	0,00
wt280_oben		257,00	0,00	0,00
wt280_unten	257,00		0,00	0,00
Mittelwert		155,00		0,00

Abschnitt 3.7.4: LA-ICP-MS Detektion eines 8-fach Multiplex-Ansatz mit Parkinson-spezifischen Antikörpern

Tabelle 40 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein NeuN bei einer Auflösung von 130 µm (ho-Typ , wt-Typ).

NeuN-MeCAT(Pr) [counts]	Singleplex		Multiplex		Singelplex & Multiplex \bar{x} (Pr/In)
	Pr/In	\bar{x} (Pr/In)	Pr/In	\bar{x} (Pr/In)	
ho842_oben	6,38E+06	5,98E+06	-	-	5,98E+06
ho842_unten	5,58E+06		-		
ho844_oben	6,78E+06	5,96E+06	-	-	5,96E+06
ho844_unten	5,13E+06		-		
ho846_oben	6,36E+06	5,84E+06	-	-	5,84E+06
ho846_unten	5,31E+06		-		
ho847_oben	4,34E+06	4,20E+06	4,76E+06	4,76E+06	4,48E+06
ho847_unten	4,05E+06		4,75E+06		
ho848_oben	4,86E+06	4,74E+06	4,43E+06	4,49E+06	4,61E+06
ho848_unten	4,61E+06		4,55E+06		
ho850_oben	5,53E+06	5,27E+06	5,21E+06	5,23E+06	5,25E+06
ho850_unten	5,02E+06		5,25E+06		
ho851_oben	4,07E+06	4,07E+06	-	-	4,07E+06
ho851_unten			-		
ho856_oben	4,39E+06	4,44E+06	-	-	4,44E+06
ho856_unten	4,49E+06		-		
ho897_oben	4,97E+06	4,60E+06	4,59E+06	4,55E+06	4,57E+06
ho897_unten	4,22E+06		4,51E+06		
ho900_oben	5,29E+06	4,41E+06	-	-	4,41E+06
ho900_unten	3,53E+06		-		
Mittelwert		4,95E+06		4,75E+06	4,96E+06
wt262_oben	-	-	-	-	-
wt262_unten	-		-		
wt263_oben	9,94E+06	9,85E+06	-	-	9,85E+06
wt263_unten	9,77E+06		-		
wt264_oben	6,50E+06	6,34E+06	-	-	6,34E+06
wt264_unten	6,18E+06		-		
wt267_oben	9,84E+06	1,09E+07	9,91E+06	1,04E+07	1,06E+07
wt267_unten	1,19E+07		1,09E+07		
wt269_oben	8,95E+06	9,03E+06	-	-	9,03E+06
wt269_unten	9,11E+06		-		
wt270_oben	1,24E+07	1,20E+07	1,24E+07	1,13E+07	1,16E+07
wt270_unten	1,15E+07		1,02E+07		
wt272_oben	1,31E+07	1,25E+07	1,09E+07	1,10E+07	1,18E+07
wt272_unten	1,20E+07		1,11E+07		
wt276_oben	8,75E+06	8,74E+06	8,63E+06	8,78E+06	7,43E+06
wt276_unten	8,74E+06		8,92E+06		
wt279_oben	6,23E+06	6,09E+06	-	-	6,09E+06
wt279_unten	5,94E+06		-		
wt280_oben	-	-	8,34E+06	8,55E+06	8,55E+06
wt280_unten	-		8,75E+06		
Mittelwert		9,43E+06		1,00E+07	9,04E+06

Tabelle 41 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein GFAP bei einer Auflösung von 130 µm (ho-Typ , wt-Typ).

GFAP-MeCAT(Ho) [counts]	Singleplex		Multiplex		Singelplex & Multiplex X̄ (Ho/In)
	Ho/In	X̄ (Ho/In)	Ho/In	X̄ (Ho/In)	
ho842_oben ho842_unten	- -	-	- -	-	-
ho844_oben ho844_unten	1,78E+06 1,70E+06	1,74E+06	- -	-	1,74E+06
ho846_oben ho846_unten	1,50E+06 1,42E+06	1,46E+06	- -	-	1,46E+06
ho847_oben ho847_unten	1,16E+06 1,36E+06	1,26E+06	1,12E+06 1,20E+06	1,16E+06	1,21E+06
ho848_oben ho848_unten	1,29E+06 1,23E+06	1,26E+06	1,20E+06 1,24E+06	1,22E+06	1,24E+06
ho850_oben ho850_unten	1,30E+06 1,59E+06	1,44E+06	1,30E+06 1,51E+06	1,40E+06	1,42E+06
ho851_oben ho851_unten	1,42E+06 1,35E+06	1,38E+06	- -	-	1,38E+06
ho856_oben ho856_unten	1,26E+06 1,43E+06	1,34E+06	- -	-	1,34E+06
ho897_oben ho897_unten	1,58E+06 1,59E+06	1,58E+06	1,87E+06 1,85E+06	1,86E+06	1,72E+06
ho900_oben ho900_unten	1,24E+06 1,27E+06	1,25E+06	- -	-	1,25E+06
Mittelwert		1,41E+06		1,41E+06	1,42E+06
wt262_oben wt262_unten	9,00E+05 9,16E+05	9,08E+05	- -	-	9,08E+05
wt263_oben wt263_unten	9,20E+05 8,90E+05	9,05E+05	- -	-	9,05E+05
wt264_oben wt264_unten	8,76E+05 9,21E+05	8,99E+05	- -	-	8,99E+05
wt267_oben wt267_unten	9,25E+05 8,86E+05	9,05E+05	9,12E+05 8,89E+05	9,01E+05	9,03E+05
wt269_oben wt269_unten	- -	-	- -	-	-
wt270_oben wt270_unten	8,81E+05 9,22E+05	9,02E+05	9,15E+05 8,90E+05	9,03E+05	9,02E+05
wt272_oben wt272_unten	9,03E+05 8,82E+05	8,93E+05	9,18E+05 8,66E+05	8,92E+05	8,92E+05
wt276_oben wt276_unten	8,92E+05 9,23E+05	9,08E+05	9,07E+05 9,09E+05	9,08E+05	9,08E+05
wt279_oben wt279_unten	8,89E+05 9,01E+05	8,95E+05	- -	-	8,95E+05
wt280_oben wt280_unten	9,13E+05 8,99E+05	9,06E+05	9,44E+05 8,75E+05	9,09E+05	9,08E+05
Mittelwert		9,02E+05		9,03E+05	9,02E+05

Tabelle 42 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein TH bei einer Auflösung von 130 µm (ho-Typ , wt-Typ).

TH-MeCAT(Tb) [counts]	Singleplex		Multiplex		Singelplex & Multiplex \bar{x} (Tb/In)
	Tb/In	\bar{x} (Ho/In)	Tb/In	\bar{x} (Tb/In)	
ho842_oben	3,58E+05	3,73E+05	-	-	3,73E+05
ho842_unten	3,88E+05		-		
ho844_oben	3,83E+05	3,89E+05	-	-	3,89E+05
ho844_unten	3,95E+05		-		
ho846_oben	3,73E+05	3,70E+05	-	-	3,70E+05
ho846_unten	3,68E+05		-		
ho847_oben	3,24E+05	3,25E+05	3,38E+05	3,51E+05	3,38E+05
ho847_unten	3,26E+05		3,64E+05		
ho848_oben	3,66E+05	3,61E+05	3,57E+05	3,63E+05	3,62E+05
ho848_unten	3,57E+05		3,69E+05		
ho850_oben	3,75E+05	3,75E+05	3,16E+05	3,36E+05	3,56E+05
ho850_unten	3,75E+05		3,57E+05		
ho851_oben	3,74E+05	3,77E+05	-	-	3,77E+05
ho851_unten	3,81E+05		-		
ho856_oben	-	-	-	-	-
ho856_unten	-		-		
ho897_oben	3,31E+05	3,43E+05	3,46E+05	3,46E+05	3,44E+05
ho897_unten	3,55E+05		3,46E+05		
ho900_oben	3,42E+05	3,60E+05	-	-	3,60E+05
ho900_unten	3,78E+05		-		
Mittelwert		3,64E+05		3,49E+05	3,63E+05
wt262_oben	3,84E+05	3,97E+05	-	-	3,97E+05
wt262_unten	4,09E+05		-		
wt263_oben	3,65E+05	3,84E+05	-	-	3,84E+05
wt263_unten	4,03E+05		-		
wt264_oben	-	-	-	-	-
wt264_unten	-		-		
wt267_oben	-	-	3,71E+05	3,82E+05	3,82E+05
wt267_unten	-		3,92E+05		
wt269_oben	4,08E+05	3,95E+05	-	-	3,95E+05
wt269_unten	3,81E+05		-		
wt270_oben	3,56E+05	3,86E+05	3,81E+05	3,71E+05	3,78E+05
wt270_unten	4,15E+05		3,61E+05		
wt272_oben	3,90E+05	3,74E+05	3,92E+05	3,71E+05	3,72E+05
wt272_unten	3,58E+05		3,50E+05		
wt276_oben	3,89E+05	3,84E+05	3,81E+05	3,68E+05	3,76E+05
wt276_unten	3,79E+05		3,56E+05		
wt279_oben	3,90E+05	3,96E+05	-	-	3,96E+05
wt279_unten	4,02E+05		-		
wt280_oben	-	-	3,99E+05	3,75E+05	3,75E+05
wt280_unten	-		3,51E+05		
Mittelwert		3,88E+05		3,73E+05	3,84E+05

Tabelle 43 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein α -Synuclein bei einer Auflösung von 130 μm (ho-Typ , wt-Typ).

α -synuclein-MeCAT(Eu) [counts]	Singleplex		Multiplex		Singelplex & Multiplex \bar{X} (Eu/In)
	Eu/In	\bar{X} (Eu/In)	Eu/In	\bar{X} (Eu/In)	
ho842_oben	6,98E+06	6,84E+06	-	-	6,84E+06
ho842_unten	6,71E+06		-		
ho844_oben	7,43E+06	7,53E+06	-	-	7,53E+06
ho844_unten	7,64E+06		-		
ho846_oben	7,47E+06	7,55E+06	-	-	7,55E+06
ho846_unten	7,64E+06		-		
ho847_oben	-	-	6,87E+06	6,72E+06	6,72E+06
ho847_unten	-		6,57E+06		
ho848_oben	4,18E+06	4,17E+06	4,09E+06	4,05E+06	4,11E+06
ho848_unten	4,16E+06		4,02E+06		
ho850_oben	5,12E+06	4,90E+06	5,12E+06	5,10E+06	5,00E+06
ho850_unten	4,68E+06		5,08E+06		
ho851_oben	4,21E+06	3,88E+06	-	-	3,88E+06
ho851_unten	3,55E+06		-		
ho856_oben	3,64E+06	4,99E+06	-	-	4,99E+06
ho856_unten	6,34E+06		-		
ho897_oben	4,03E+06	4,11E+06	4,89E+06	4,86E+06	4,49E+06
ho897_unten	4,19E+06		4,83E+06		
ho900_oben	5,79E+06	4,24E+06	-	-	4,24E+06
ho900_unten	2,68E+06		-		
Mittelwert		5,36E+06		5,18E+06	5,54E+06
wt262_oben	-	-	-	-	-
wt262_unten	-		-		
wt263_oben	6,32E+04	6,21E+04	-	-	6,21E+04
wt263_unten	6,10E+04		-		
wt264_oben	-	-	-	-	-
wt264_unten	-		-		
wt267_oben	-	-	5,94E+04	6,76E+04	6,76E+04
wt267_unten	-		7,59E+04		
wt269_oben	-	-	-	-	-
wt269_unten	-		-		
wt270_oben	6,58E+04	6,55E+04	6,50E+04	6,45E+04	6,50E+04
wt270_unten	6,52E+04		6,40E+04		
wt272_oben	-	-	5,04E+04	5,04E+04	5,04E+04
wt272_unten	-		5,03E+04		
wt276_oben	6,33E+04	6,32E+04	6,19E+04	6,19E+04	6,26E+04
wt276_unten	6,32E+04		6,19E+04		
wt279_oben	6,34E+04	5,58E+04	-	-	5,58E+04
wt279_unten	4,81E+04		-		
wt280_oben	4,13E+04	4,12E+04	4,06E+04	4,49E+04	4,31E+04
wt280_unten	4,11E+04		4,92E+04		
Mittelwert		5,76E+04		5,79E+04	5,81E+04

Tabelle 44 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein NNe (ho-Typ , wt-Typ).

Probennr. NeuN-MeCAT(Pr)	Peakflä. (Splex) [counts]	Peakflä. (Mplex) [counts]	\bar{X} (Peakflä.) [counts]	SD [counts]	RSD [%]
ho847_oben	4,34E+06	4,76E+06	4,48E+06	3,43E+05	8
ho847_unten	4,05E+06	4,75E+06			
ho848_oben	4,86E+06	4,43E+06	4,61E+06	1,83E+05	4
ho848_unten	4,61E+06	4,55E+06			
ho850_oben	5,53E+06	5,21E+06	5,25E+06	2,10E+05	4
ho850_unten	5,02E+06	5,25E+06			
ho897_oben	4,97E+06	4,59E+06	4,57E+06	3,08E+05	7
ho897_unten	4,22E+06	4,51E+06			
wt267_oben	9,84E+06	9,91E+06	1,06E+07	9,91E+05	9
wt267_unten	1,19E+07	1,09E+07			
wt270_oben	1,24E+07	1,24E+07	1,16E+07	1,06E+06	9
wt270_unten	1,15E+07	1,02E+07			
wt272_oben	1,31E+07	1,09E+07	1,18E+07	9,92E+05	8
wt272_unten	1,20E+07	1,11E+07			
wt276_oben	8,75E+06	8,63E+06	8,76E+06	1,21E+05	1
wt276_unten	8,74E+06	8,92E+06			
wt280_oben	-	8,34E+06	8,55E+06	2,93E+05	-
wt280_unten	-	8,75E+06			

Tabelle 45 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein GFAP (ho-Typ , wt-Typ).

Probennr. GFAP-MeCAT(Ho)	Peakflä. (Splex) [counts]	Peakflä. (Mplex) [counts]	\bar{X} (Peakflä.) [counts]	SD [counts]	RSD [%]
ho847_oben	1,16E+06	1,12E+06	1,21E+06	1,02E+05	8
ho847_unten	1,36E+06	1,20E+06			
ho848_oben	1,29E+06	1,20E+06	1,24E+06	3,66E+04	3
ho848_unten	1,23E+06	1,24E+06			
ho850_oben	1,30E+06	1,30E+06	1,42E+06	1,48E+05	10
ho850_unten	1,59E+06	1,51E+06			
ho897_oben	1,58E+06	1,87E+06	1,72E+06	1,60E+05	9
ho897_unten	1,59E+06	1,85E+06			
wt267_oben	9,25E+05	9,12E+05	9,03E+05	1,87E+04	2
wt267_unten	8,86E+05	8,89E+05			
wt270_oben	8,81E+05	9,15E+05	9,02E+05	1,95E+04	2
wt270_unten	9,22E+05	8,90E+05			
wt272_oben	9,03E+05	9,18E+05	8,92E+05	2,29E+04	3
wt272_unten	8,82E+05	8,66E+05			
wt276_oben	8,92E+05	9,07E+05	9,08E+05	1,27E+04	1
wt276_unten	9,23E+05	9,09E+05			
wt280_oben	9,13E+05	9,44E+05	9,08E+05	2,87E+04	3
wt280_unten	8,99E+05	8,75E+05			

Tabelle 46 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein TH (ho-Typ , wt-Typ).

Probennr. TH-MeCAT(Tb)	Peakflä. (Splex) [counts]	Peakflä. (Mplex) [counts]	\bar{X} (Peakflä.) [counts]	SD [counts]	RSD [%]
ho847_oben	3,24E+05	3,38E+05	3,38E+05	1,84E+04	5
ho847_unten	3,26E+05	3,64E+05			
ho848_oben	3,66E+05	3,57E+05	3,62E+05	6,04E+03	2
ho848_unten	3,57E+05	3,69E+05			
ho850_oben	3,75E+05	3,16E+05	3,56E+05	2,80E+04	8
ho850_unten	3,75E+05	3,57E+05			
ho897_oben	3,31E+05	3,46E+05	3,44E+05	9,90E+03	3
ho897_unten	3,55E+05	3,46E+05			
wt267_oben	-	3,71E+05	3,82E+05	-	-
wt267_unten	-	3,92E+05			
wt270_oben	3,56E+05	3,81E+05	3,78E+05	2,68E+04	7
wt270_unten	4,15E+05	3,61E+05			
wt272_oben	3,90E+05	3,92E+05	3,72E+05	2,15E+04	6
wt272_unten	3,58E+05	3,50E+05			
wt276_oben	3,89E+05	3,81E+05	3,76E+05	1,43E+04	4
wt276_unten	3,79E+05	3,56E+05			
wt280_oben	-	3,99E+05	3,75E+05	-	-
wt280_unten	-	3,51E+05			

Tabelle 47 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein α -Synuclein (ho-Typ , wt-Typ).

Probennr. Syn-MeCAT(Eu)	Peakflä. (Splex) [counts]	Peakflä. (Mplex) [counts]	\bar{X} (Peakflä.) [counts]	SD [counts]	RSD [%]
ho847_oben	-	6,87E+06	6,72E+06	-	-
ho847_unten	-	6,57E+06			
ho848_oben	4,18E+06	4,09E+06	4,11E+06	7,36E+04	2
ho848_unten	4,16E+06	4,02E+06			
ho850_oben	5,12E+06	5,12E+06	5,00E+06	2,14E+05	4
ho850_unten	4,68E+06	5,08E+06			
ho897_oben	4,03E+06	4,89E+06	4,49E+06	4,37E+05	10
ho897_unten	4,19E+06	4,83E+06			
wt267_oben	-	-	-	-	-
wt267_unten	-	-			
wt270_oben	6,58E+04	6,50E+04	6,50E+04	7,15E+02	1
wt270_unten	6,52E+04	6,40E+04			
wt272_oben	-	5,04E+04	5,04E+04	-	-
wt272_unten	-	5,03E+04			
wt276_oben	6,33E+04	6,19E+04	6,26E+04	7,46E+02	1
wt276_unten	6,32E+04	6,19E+04			
wt280_oben	4,13E+04	4,06E+04	4,31E+04	4,12E+03	10
wt280_unten	4,11E+04	4,92E+04			

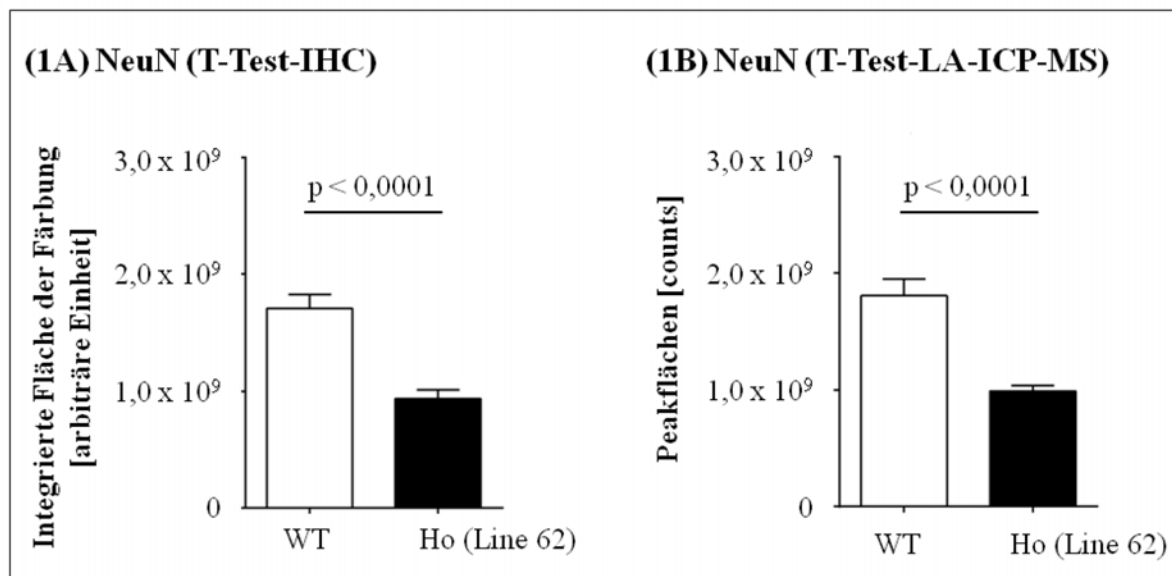
Abschnitt 3.7.5: LA-ICP-MS Detektion vs. IHC-Färbung

Abbildung 78 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (1A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (1B) für den Biomarker NeuN zur Berechnung des T-Tests (p).

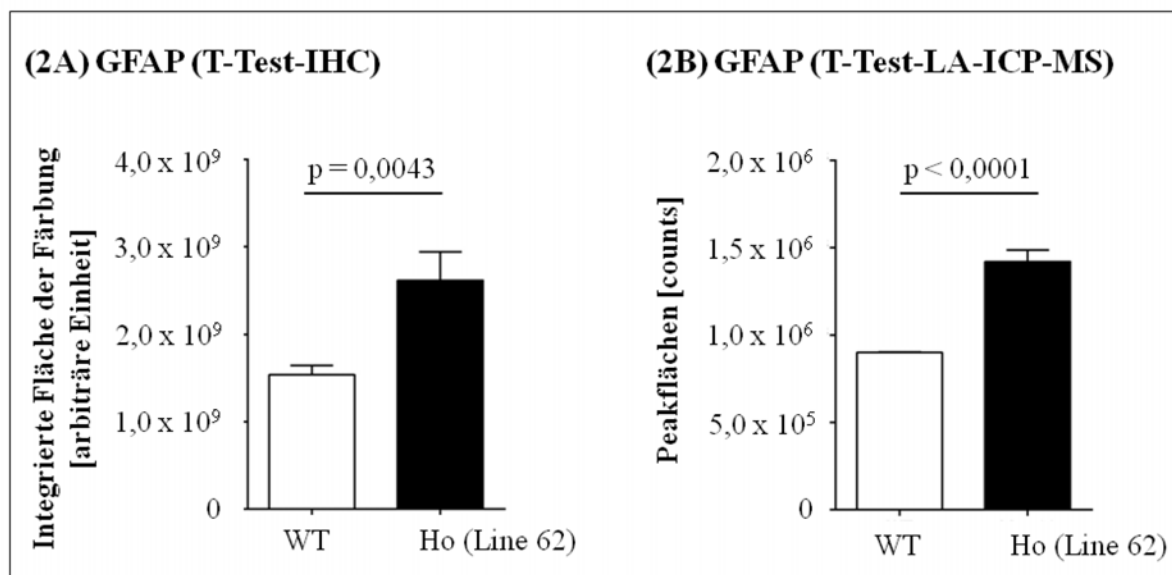


Abbildung 79 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (2A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (2B) für den Biomarker GFAP zur Berechnung des T-Tests (p).

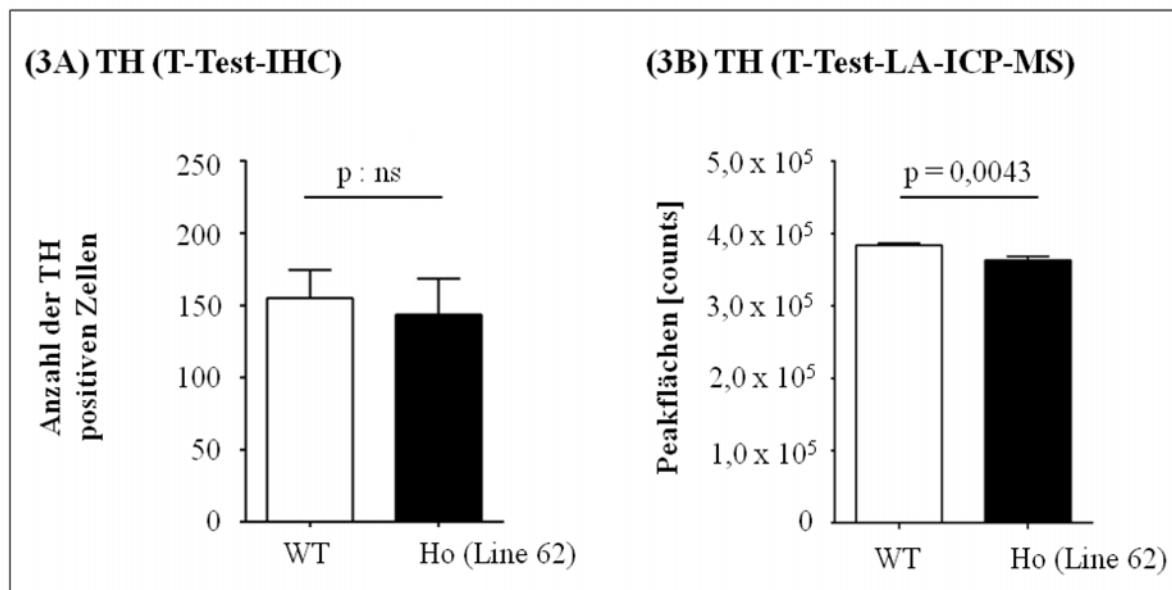


Abbildung 80 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (3A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (3B) für den Biomarker TH zur Berechnung des T-Tests (p).

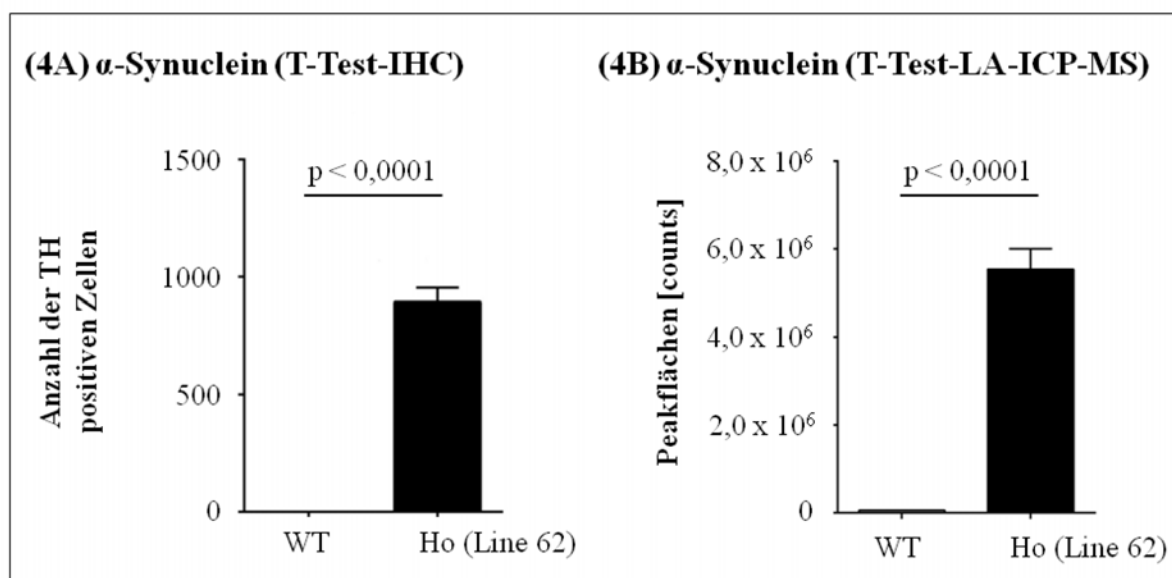


Abbildung 81 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (4A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (4B) für den Biomarker α -Synuclein zur Berechnung des T-Tests (p).

8.1 Literaturverzeichnis

- [1] K. Wrobel, K. Wrobel und J. Caruso, Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393, 481-486.
- [2] R. C. Murphy und A. H. J. Merrill, Lipidomics and imaging mass spectrometry, *Biochimica et biophysica acta*, 2011, 1811, 635-636.
- [3] L. S. Eberlin, X. H. Liu, C. R. Ferreira, S. Santagata, N. Y. R. Agar und R. G. Cooks, Desorption Electrospray Ionization then MALDI Mass Spectrometry Imaging of Lipid and Protein Distributions in Single Tissue Sections, *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 8366-8371.
- [4] E. H. Seeley und R. M. Caprioli, Imaging mass spectrometry: Towards clinical diagnostics, *Proteomics Clinical Applications*, 2008, 2, 1435-1443.
- [5] D. Hare, C. Austin und P. Doble, Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analyst*, 2012, 137, 1527-1537.
- [6] R. Lobiński, D. Schaumlöffel und J. Szpunar, Mass Spectrometry in Bioinorganic, *Analytical Chemistry, Mass Spectrometry Reviews*, 2006, 25, 255-289.
- [7] J. Becker, M. Zoriy, A. Matusch, Wu, D. Salber, C. Palm und J. Becker, Bioimaging of Metals by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 2010, 29, 156– 175.
- [8] A. Sanz-Medel, From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381(1), 1-2.
- [9] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón und M. Sánchez, Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377(2), 236-247.
- [10] J. Szpunar, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *Analyst*, 2005, 130(4), 442-465.

-
- [11] N. Jakubowski, R. Lobinski und L. Moens, Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19, 1-4.
- [12] J. S. Becker, S. Mounicou, M. V. Zoriy, J. S. Becker and R. Lobinski, Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Talanta*, 2008, 76, 1183-1188.
- [13] J. S. Becker, M. Zoriy, J. S. Becker, C. Pickhardt, E. Damoc, G. Juhacz, M. Palkovits und M. Przybylski, Determination of Phosphorus-, Copper-, and Zinc-Containing Human Brain Proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS, *Analytical Chemistry*, 2005, 77(18), 5851-5860.
- [14] S. H. Hu, S. C. Zhang, Z. C. Hu, Z. Xing und X. R. Zhang, Detection of multiple proteins on one spot by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and application to immuno-microarray with element-tagged antibodies, *Analytical Chemistry*, 2007, 79(3), 923-929.
- [15] C. Giesen, H. A. O. Wang, D. Schapiro, N. Zivanovic, A. Jacobs, B. Hattendorf, P. J. Schöffler, D. Grolimund, J. M. Buhmann, S. Brandt, Z. Varga, P. J. Wild, D. Günther und B. Bodenmiller, „Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry,“ *Nature Methods*, 2014, 417–422.
- [16] S. Wang, R. Brown und D. J. Gray, Application of Laser Ablation-ICP-MS to the Spatially Resolved Micro-analysis of Biological Tissue, *Applied Spectroscopy*, 1994, 48, 1321-1325.
- [17] J. S. Becker and R. Lobinski, Metal imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins, *Metallomics*, 2009, 1, 312-316.
- [18] A. Matusch, C. Depboylu, C. Palm, B. Wu, G. U. Hoglinger, M. K. H. Schafer und J. S. Becker, Cerebral Bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS), *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, 21, 161-171.

-
- [19] C. G. Fraga, Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health, *Molecular aspects of medicine*, 2005, 26(4-5), 235-244.
- [20] J. S. Becker, A. Matusch, B. Wu, C. Palm, A. J. Becker and D. Salber, Mass spectrometric imaging (MSI) of metals using advanced Brain Met techniques for biomedical research, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011, 307, 3-15.
- [21] J. S. Becker and D. Salber, New mass spectrometric tools in brain research, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29, 966-979.
- [22] S. F. Durrant, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14(9), 1385-1403.
- [23] A. Raith und R. C. Hutton, QUANTITATION METHODS USING LASER-ABLATION ICP-MS .1. ANALYSIS OF POWDERS, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1994, 350(4-5), 242-246.
- [24] D. Kang, D. Amarasiriwardena und A. H. Goodman, Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(6), 1608-1615.
- [25] E. Hoffmann, H. Stephanowitz, E. Ullrich, J. Skole, C. Ludke und B. Hoffmann, Investigation of mercury migration in human teeth using spatially resolved analysis by laser ablation-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, 15(6), 663-667.
- [26] C. Austin, F. Fryer, J. Lear, D. Bishop, D. Hare, T. Rawling, L. Kirkup, A. McDonagh and P. Doble, Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, 26, 1494-1501.
- [27] D. A. Frick and D. Gunther, Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2012, 27(8), 1294-1303.

-
- [28] C. Giesen, L. Waentig, T. Mairinger, D. Drescher, J. Kneipp, P. H. Roos, U. Panne and N. Jakubowski, Iodine as an elemental marker for imaging of single cells and tissue sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, 26, 2160-2165.
- [29] I. Konz, B. Fernandez, L. Fernandez, R. Pereiro, H. González, L. Álvarez, M. Coca-Prados und A. Sanz-Medel, Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 3091-3096.
- [30] M. Bonta, H. Lohninger, M. Marchetti-Deschmann und A. Limbeck, Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments, *Analyst*, 2014, 139, 1521-1531.
- [31] M. Angelo, S. C. Bendall, R. Finck, M. B. Hale, C. Hitzman, A. D. Borowsky, R. M. Levenson, J. M. Lowe, S. D. Liu, S. Y. Zhao und G. P. Nolan, Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors, *Nature Medicine*, 2014, 1-7.
- [32] D. J. Hare, P. Lei, S. Ayton, B. R. Roberts, R. Grimm, J. L. George, D. P. Bishop, A. D. Beavis, S. J. Donovan, G. McColl, I. Volitakis, C. L. Masters, P. A. Adlard, R. A. Cherny, A. I. Bush, D. I. Finkelstein und P. A. Doble, An iron–dopamine index predicts risk of parkinsonian neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta, *Chemical Science*, 2014, 5, 2160-2169.
- [33] A. Matusch, A. Bauer und J. S. Becker, Element imaging in formalin fixed slices of human mesencephalon, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011, 307(1-3), 240-244.
- [34] M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, A. Matusch und J. S. Becker, Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2008, 63(3), 375-382.
- [35] J. S. Becker, M. V. Zoriy, J. S. Becker, J. Dobrowolska, M. Dehnhardt and A. Matusch, Elemental imaging mass spectrometry of thin sections of tissues and analysis of brain proteins in gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *PHYSICA STATUS SOLIDI C-CURRENT TOPICS IN SOLID STATE PHYSICS*, 2007, 4(6), 1775-1784.

-
- [36] B. Jackson, S. Harper, L. Smith und J. Flinn, Elemental mapping and quantitative analysis of Cu, Zn, and Fe in rat brain sections by laser ablation ICP-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384, 951-957.
- [37] D. Pozebon, V. L. Dressler, M. F. Mesko, A. Matusch und J. S. Becker, Bioimaging of metals in thin mouse brain section by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: novel online quantification strategy using aqueous standards, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25(11), 1739-1744.
- [38] I. Konz, B. Fernandez, M. L. Fernandez, R. Pereiro und A. Sanz-Medel, Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403, 2113-2125.
- [39] J. S. Becker, U. Breuer, H. F. Hsieh, T. Osterholt, U. Kumtabtim, B. Wu, A. Matusch, J. A. Caruso and Z. Y. Qin, Bioimaging of Metals and Biomolecules in Mouse Heart by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Secondary Ion Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 9528-9533.
- [40] D. Grube, Constants and variables in immunohistochemistry, *Archives of Histology and Cytology*, 2004, 62(2), 115-134.
- [41] G. Sauter, R. Simon und K. Hillan, Tissue microarrays in drug discovery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 962-972.
- [42] L. Bubendorf, A. Nocito, H. Moch and G. Sauter, Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies, *The Journal of Pathology*, 2001, 195, 72-79.
- [43] M. Holtzhauer, *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996, 379-387.
- [44] H. Tsurui, H. Nishimura, S. Hattori, S. Hirose, K. Okumura und T. Shirai, Seven-color Fluorescence Imaging of Tissue Samples Based on Fourier Spectroscopy and Singular Value Decomposition, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2000, 48(5), 653-662.
- [45] C. Giesen, L. Waentig, U. Panne und N. Jakubowski, History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2012, 76, 27-39.

-
- [46] R. W. Hutchinson, A. G. Cox, C. W. McLeod, P. S. Marshall, A. Harper, E. L. Dawson and D. R. Howlett, Imaging and spatial distribution of beta-amyloid peptide and metal ions in Alzheimer's plaques by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 2005, 346, 225-233.
- [47] S. D. Müller, R. A. Diaz-Bone, J. Felix und W. Goedecke, Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, 20, 907-911.
- [48] C. Zhang, F. B. Wu, Y. Y. Zhang, X. Wang und X. R. Zhang, A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16(12), 1393-1396.
- [49] L. Waentig, P. H. Roos und N. Jakubowski, Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24, 924-933.
- [50] L. Waentig, N. Jakubowski, H. Hayen und P. H. Roos, Iodination of proteins, proteomes and antibodies with potassium triiodide for LA-ICP-MS based proteomic analyses, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, 26, 1610-1618.
- [51] L. Waentig, N. Jakubowski und P. H. Roos, Multi-parametric analysis of cytochrome P450 expression in rat liver microsomes by LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, 26, 310-319.
- [52] C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski and U. Panne, Multiplexed Immunohistochemical Detection of Tumor Markers in Breast Cancer Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 8177-8183.
- [53] T. C. de Bang, P. P. Pedas, J. K. Schjoerring, P. E. Jensen und S. Husted, Multiplexed quantification of plant thylakoid proteins on Western blots using lanthanide-labeled antibodies and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Analytical Chemistry*, 2013, 85, 5047-5054.

-
- [54] X. D. Lou, G. H. Zhang, I. Herrera, R. Kinach, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz und M. A. Winnik, Polymer-based elemental tags for sensitive Bioassays, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46, 6111-6114.
- [55] L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P. Roos und M. W. Linscheid, Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2012, 27, 1311-1320.
- [56] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kühn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner und M. W. Linscheid, A Metal-coded Affinity Tag Approach to Quantitative Proteomics, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6, 1907-1916.
- [57] D. Esteban-Fernández, C. Scheler und M. W. Linscheid, Absolute protein quantification by LC-ICP-MS using MeCAT peptide labeling, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401, 657-666.
- [58] J. Bettmer, M. M. Bayon, J. R. Encinar, M. L. F. Sanchez, M. D. F. de la Campa und A. S. Medel, The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis, *Journal of Proteomics*, 2009, (72), 989-1005.
- [59] R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray und C. E. Taylor, Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, *Analytical Chemistry*, 1980, 52, 2283-2289.
- [60] D. Schaumlöffel, P. Giusti, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, J. Szpunar, R. Łobiński und J. S. Becker, Ultratrace determination of uranium and plutonium by nano-volume flow injection double-focusing sector field inductively coupled plasma mass spectrometry (nFI-ICP-SFMS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, 20, 17-21.
- [61] D. Stuewer und N. Jakubowski, Elemental Analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Sector Field Instruments: a Progress Report, *Journal of Mass Spectrometry*, 1998, 33, 579-590.
- [62] J. S. Becker und N. Jakubowski, The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences, *Chemical Society Reviews*, 2009, 38, 1969-1983.

-
- [63] F. P. Guengerich, Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity, *Chemical Research in Toxicology* 2001,14(6), 611-50.
- [64] Element XR Product Brochure. Thermo Electron.
- [65] N. Jakubowski, L. Moens und F. Vanhaecke, Sector field mass spectrometers in ICP-MS, *Spectrochimica Acta Part B*, 1998, 53, 1739-1763.
- [66] J. Szpunar, Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst*, 2000, 125, 963-988.
- [67] A. A. Ammann, Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42, 419-427.
- [68] L. Mueller, H. Traub, N. Jakubowski, D. Drescher, V. I. Baranov und J. Kneipp, Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406, 6963–6977.
- [69] I. M. Roitt, J. Brostoff und D. K. Male, *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1991, 2, 79-89.
- [70] C. Schütt und B. Bröker, *Grundwissen der Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009, 2 Auflage, 7-12.
- [71] Molecule of the Month (see the Molecule of the Month section for more details).www.pdb.org.
- [72] N. A. Campbell, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2000, 2. Auflage, 946.
- [73] A. Lyons, D. J. King, R. J. Owens, G. T. Yarranton, A. Millican, N. R. Whittle und J. R. Adair, Site-specific attachment to recombinant antibodies via introduced surface cysteine residues, *Department of Protein Engineering*, 1990, 3, 70.
- [74] D. C. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press, 2002, 34-36.
- [75] N. Tulchin, L. Ornstein und B. J. Davis, A microgel system for disk electrophoresis, *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, 485-490..
- [76] U. K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 227.

- [77] G. Nebrich, M. Herrmann, D. Sagi und J. G. P. Klose, High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification, *Elektrophoresis*, 2007, 28, 1607-1614.
- [78] J. Klose und U. Kobalz, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, 1995, 16, 1035-1059.
- [79] H. Towbin, T. Staehelin und J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(9), 4350-4354.
- [80] D. H. Wang, *Angiotensin protocols*, Humana Press Inc, 2001, 245-256.
- [81] A. Venkatachalam, C. U. Koehl, I. Feldmann, P. Lampen, A. Manz, P. H. Roos und N. Jakubowski, Detection of phosphorylated proteins blotted onto membranes using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22, 1023-1032.
- [82] J. Kyhse-Andersen, Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1984, 10, 203-209.
- [83] W. Luttermann, K. Bratke, M. Küpper und D. Myrtek, *Der Experimentator Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009, 3. Auflage, 172.
- [84] S. D. Tanner, D. R. Bandura, O. Ornatsky, V. I. Baranov, M. Nitz und M. A. Winnik, Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay, *Pure and Applied Chemistry*, 2008, 80(12), 2627-26.
- [85] G. MacBeath, Protein microarrays and proteomics, *Nature Genetics*, 2002, 32, 526-532.
- [86] S. Avrameas, Immunoenzymic techniques for biomedical analysis, *Methods in Enzymology*, 1976, (44), 709-717.
- [87] N. Jakubowski, J. Messerschmidt, M. G. Añorbe, L. H. H. Waentig and P. Roos, Labelling of proteins by use of iodination and detection by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, (23), 1487-1496.

-
- [88] G. Richter, *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, 2003, 231-251.
- [89] S. Avrameas, Enzym-Linked Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzym-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes, *International Review of Cytology* 1970, 27(1), 349-3851.
- [90] T. Rüdiger, H. Höfler, H. H. Kreipe, H. Nizze, U. Pfeifer, H. Stein, F. E. Dallenbach, H. P. Fischer und M. Mengel, Interlaboratory trial 2000 "Immunohistochemistry" of German Society for Pathology and the Professional Association of German Pathologists, *Pathologe*, 2003, 24(1), 70-78.
- [91] E. Harlow und D. Lane, *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 314-359.
- [92] J. L. Cordell, B. Falini, W. N. Erber, A. K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. Macdonald, K. A. F. Pulford, H. Stein und D. Mason, Immunoenzymatic Labeling of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes), *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1984, 32(2), 219-229.
- [93] F. Mannello, M. Malatesta, E. Fusco, G. Bianchi, A. Cardinali und G. Gazzanelli, Biochemical Characterization and Immunolocalization of Prostate-specific Antigen in Human Term Placent, *Clinical Chemistry*, 1998, 44(8), 1735-1737.
- [94] F. Lottspeich, J. Engels und A. Simeon, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, 2006, 43.
- [95] L. Tortajada-Genaro, M. Cózar, J. Moreno Frigols und C. Romero de Avila, Comparison of Immunoradiometric Assays for Determination of Thyroglobulin: A Validation Study, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2007, 21, 147-153.
- [96] L. Waentig, S. Techritz, N. Jakubowski und P. H. Roos, A multi-parametric microarray for protein profiling: simultaneous analysis of 8 different cytochromes via differentially element tagged antibodies and laser ablation ICP-MS, *Analyst*, 2013, 138, 6309-6315.
- [97] PIERCE, *Produktanweisung* (20490).
- [98] J. Wu und J. T. Watson, A novel methodology for assignment of disulfide bond pairings in proteins, *Protein Science*, 1997, 6, 391-398.

-
- [99] H. Liu, C. Chumsae, G. Gaza-Bulseco, K. Hurkmans und C. H. Radziejewski, Ranking the Susceptibility of Disulfide Bonds in Human IgG1 Antibodies by Reduction, Differential Alkylation, and LC–MS Analysis, *Analytical Chemistry*, 2010, 82(12), 5219–5226.
- [100] T. L. Kirey, Reduction and fluorescent labeling of cyst(e)ine-containing proteins for subsequent structural analyses, *Analytical Biochemistry*, 1989, 180, 231-236.
- [101] M. M. C. Sun, K. S. Beam, C. Cervený, K. J. Hamblett, R. S. Blackmore, M. Y. Torgov, F. G. Handley, N. C. Ihle, P. D. Senter und S. C. Alley, Reduction-Alkylation Strategies for the Modification of Specific Monoclonal Antibody Disulfides, *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16, 1282-1290.
- [102] K. Kafi, D. J. Betting, R. Yamada, M. Bacica, K. K. Steward und J. M. Timmerman, Maleimide conjugation markedly enhances the immunogenicity of both human and murine idiotype-KLH vaccines, *Molecular Immunology*, 2009, 46, 448-456.
- [103] X. Yan, M. Xu, L. Yang und Q. Wang, Absolute Quantification of Intact Proteins via 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-trisacetic acid-10-Maleimidoethylacetamide-Europium Labeling and HPLC Coupled with Species-Unspecific Isotope Dilution ICPMS, *Analytical Chemistry*, 82(4), 1261-1269.
- [104] N. Jakubowski, L. Waentig, H. Hayen, A. Venkatachalam, A. von Bohlen, P. H. Roos und A. Manz, Labelling of proteins with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra acetic acid and lanthanides and detection by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, (23), 1497-1507.
- [105] T. A. Corneillie, P. A. Whetstone, A. J. Fisher und C. F. Meares, A Rare Earth-DOTA-Binding Antibody: Probe Properties and Binding Affinity across the Lanthanide Series, *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125(12), 3437-3438.
- [106] A. Prange und D. Pröfrock, Chemical labels and natural element tags for the quantitative analysis of bio-molecules, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, 23, 432-459.
- [107] L. N. Klapper, M. H. Kirschbaum, M. Sela und Y. Yarden, Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors, *Advances in Cancer Research*, 2000, 77, 25-79.

-
- [108] M. J. Duffy, S. Shering, F. Sherry, E. McDermott und N. O'Higgins, CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer, *The International journal of Biological Markers's*, 2000, 15(4), 330–333.
- [109] A. P. Singh, S. C. Chauhan, M. Andrianifahanana, N. Moniaux, J. L. Meza, M. C. Copin, I. van Seuningen, M. A. Hollingsworth, J. P. Aubert und S. K. Batra, MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational mechanisms, *Oncogene*, 2007, 26, 30–41.
- [110] A. P. Singh, S. C. Chauhan, S. Bafna, S. L. Johansson, L. M. Smith, N. Moniaux, M. F. Lin und S. K. Batra, Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas, *Prostate*, 2006, 66, 421–429.
- [111] Z. Jiang, B. A. Woda, K. L. Rock, Y. Xu, L. Savas, A. Khan, G. Pihan, F. Cai, J. S. Babcook, P. Rathanaswami, S. G. Reed, J. Xu und G. R. Fanger, P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma, *The American Journal of Surgical Pathology*. 2001, 5(11),1397.
- [112] Z. Jiang, C. Wu, B. A. Woda, K. Dresse, J. Xu, G. R. Fanger und X. J. Yang, P504S/ α -methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. *The American Journal of Surgical Pathology*, *The American Journal of Surgical Pathology*, 2002, 26(9),1169.
- [113] X. J. Yang, C. Wu, B. A. Woda, K. Dresser, M. Tretiakova, G. R. Fanger und Z. Jiang, Expression of α -methylacyl-CoA racemase (P504S) in atypical adenomatous hyperplasia of the prostate, *The American Journal of Surgical Pathology*, 2002, 26(7), 921.
- [114] M. Zhou, Z. Jiang und J. I. Epstein, Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer, *The American Journal of Surgical Pathology* 2003, 27(6), 772.
- [115] R. Beach, A. M. Gown, M. N. de Peralta-Venturina, A. L. Folpe, H. Yaziji, P. G. Salles, D. J. Grignon, G. R. Fanger und M. G. Amin, P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies, *The American Journal of Surgical Pathology*, 2002, 26(12), 158.

-
- [116] C. L. Wu, X. J. Yang, M. Tretiakova, K. T. Patton, E. F. Halpern, B. A. Woda, R. H. Young und Z. Jiang, Analysis of α -methylacyl-coA racemase (P504S) expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, *Human Pathology*, 2004, 35(8), 1008-1013.
- [117] Z. Jiang, B. Woda, C. L. Wu und X. Yang, Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker, *American Journal of Clinical Pathology*, 2004, 122, 275-289.
- [118] J. Xu, J. A. Stolk, X. Zhang, S. J. Silva, R. L. Houghton, M. Matsumura, T. S. Vedvick, K. B. Leslie, R. Badaro und S. G. Reed, Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray, *Cancer Research*, 2000, 60, 1677.
- [119] Z. Jiang, G. R. Fanger, B. A. Woda, B. F. Banner, P. Algate, K. Dresser, J. Xu und P. G. Chu, Expression of α -methylacyl-CoA racemase (P504S) in various malignant neoplasms and normal tissues: A study of 761 cases, *Human Pathology*, 2003, 34(8), 792.
- [120] D. G. Bostwick, A. Pacelli, M. Blute, P. Roche und G. P. Murphy, Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases, *Cancer*, 1998, 82(11), 2256-2261.
- [121] A. K. Gregorakis, E. H. Holmes und G. P. Murphy, Prostate-specific membrane antigen: current and future utility, *Seminars in Urologic Oncology*, 1998, 16(1), 2-12 .
- [122] S. S. Chang, V. E. Reute, W. D. Heston, N. H. Bander, L. S. Grauer und P. B. Gaudin, Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature, *Cancer Research*, 1999, 59(13), 3192-3198.
- [123] D. A. Silver, I. Pellicer, W. R. Fair, W. D. Heston und C. Cordon-Cardo, Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues, *Clinical Cancer Research*, 1997, 3(1), 81-85.
- [124] W. D. W. Heston, Der Pathologe: Bedeutung des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) Eine Neurocarboxypeptidase und Membran-Float-Hydrolase, Springer Verlag, 1996, 35(5), 400.

- [125] G. P. Murphy, A. L. Boynton, E. H. Holmes und W. T. Tino, Monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen, United States Patent, 2000, 6, 150, 508.
- [126] K. Park, S. A. Tomlins, K. M. Mudaliar, Y. L. Chiu, R. Esgueva und R. Mehra, Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer, *Neoplasia*, 2010, 12, 590-598.
- [127] G. J. van Leenders, J. L. Boormans, C. J. Vissers, A. M. Hoogland, A. Bressers und B. Furusato, Antibody EPR3864 is specific for ERG genomic fusions in prostate cancer: implications for pathological practice, *Modern Pathology*, 2011, 24, 1128-1138.
- [128] T. Oikawa, ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy, *Cancer Science*, 2004, 95, 626-633.
- [129] Y. H. Zhuang, M. Bläuer, A. Pekki und P. Tuohimaa, Subcellular location of androgen receptor in rat prostate seminal vesicle and human osteosarcoma MG-63 cells, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 41(3-8), 693.
- [130] O. A. Jänne, J. J. Palvimo, P. Kallio und M. Mehto, Androgen receptor and mechanism of androgen action, *Annals of Medicine*, 1993, 25, 83.
- [131] R. M. Bryan, R. J. Mercer, R. C. Bennett, G. C. Rennie, T. H. Lie und F. J. Morgan, Androgen receptors in breast cancer, *Cancer*, 1984, 54(11), 2436.
- [132] S. Chadha, B. R. Rao, B. J. Slotman, C. C. J. van Vroonhoven und T. H. van der Kwast, An immunohistochemical evaluation of androgen and progesterone receptors in ovarian tumors, *Human Pathology*, 1993, 24(1), 90.
- [133] I. R. Kühne, J. de Graapf, B. R. Rao und J. G. Stolk, Androgen receptor predominance in human ovarian carcinoma, *Journal of Steroid Biochemistry*, 1987, 26(3), 393.
- [134] S. Y. Nakada, P. A. di Sanl'Agnese, R. A. Moynes, R. A. Hiipakka, S. Liao und A. T. K. Cockett, The androgen receptor status of neuroendocrine cells in human benign and malignant prostatic tissue, *Cancer Research*, 1993, 53, 1967.
- [135] A. Weindl, Demenzen in Theorie und Praxis, „Parkinson Plus“ / Lewy-Körper-Demenz, Chorea Huntington und andere Demenzen bei Basalganglienerkrankungen, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 83-107.

-
- [136] M. C. Chartier-Harlin, J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Levecque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer und A. Destée, α -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *The Lancet*, 2004, 364, 1167–1169.
- [137] R. Kruger, W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schols und O. Riess, Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease, *Nature Genetics*, 1998, 18, 106–108 .
- [138] D. M. Maraganore, M. de Andrade, A. Elbaz, M. J. Farrer, J. P. Ioannidis, R. Kruger, W. A. Rocca, N. K. Schneider, T. G. Lesnick und S. J. Lincoln, Collaborative analysis of α -synuclein gene promoter variability and Parkinson disease, *Journal of the American Medical Association*, 2006, 296, 661-670.
- [139] M.G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes und M. Goedert, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature*, 1997, 388, 839–840.
- [140] S. Georg, N. L. Rey, N. Reichenbach, J. A. Steiner und P. Brundin, alpha-Synuclein: the long distance runner, *Brain Pathology*, 2013, 23, 350-357.
- [141] R. Krüger, A. M. M. Vieira-Saecker, W. Kuhn, D. Berg, T. Müller und N. Kühnet, Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Annals of Neurology*, 1999, 45(5), 611 - 617.
- [142] D. M. Maraganore, UCHL1 Is a Parkinson's Disease Susceptibility Gene, *Annals of Neurology*, 2004, 55, 512-521.
- [143] O. von Bohlen und Halbach, Synucleins and their relationship to Parkinson's disease, *Cell and Tissue Research*, 2004, 318, 163-174.
- [144] J. Koolman und K. H. Röhm, *Taschenatlas Biochemie des Menschen*, Georg Thieme Verlag Stuttgart (4. Auflage), 2009, 4, 70.
- [145] M. Brenner, W. C. Kisseberth, Y. Su, F. Besnard und A. Messing, GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice, *The Journal of Neuroscience*, 1994, 3, 1030-1037.
- [146] R. J. Mullen, C. R. Buck und A. M. Smith, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates, *Development* 1992,116,201-211.

- [147] H. B. Sarnat, D. Nochlin und D. E. Born, Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system, *Brain and Development*, 1998, 20, 88-94.
- [148] H. K. Wolf, R. Buslei, R. Schmidt-Kastner, P. K. Schmidt-Kastner, T. T. Pietsch, O. D. Wiestler und I. Blümcke, NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1996, 44, 1167-1171.
- [149] A. J. Todd, R. C. Spike und E. Polgár, A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn, *Neuroscience*, 1998, 85, 459-473.
- [150] W. A. Eckert und J. Kartenbeck, *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*, Springer-Verlag Heidelberg 1997, 1.
- [151] H. Rehm und F. Hamma, *Biochemie light*, Verlag Harri Deutsch GmbH, 2008, 9.
- [152] D. Ganten und K. Ruckpaul, *Grundlagen Der Molekularen Medizin*, Springer Verlag Heidelberg (2. Auflage) 1997, 2003, 11.
- [153] S. Lubert, *Biochemie, Spektrum der Wissenschaft*, Verlag Heidelberg (4. Auflage), 1996, 526.
- [154] A. Arif, P. Chatterjee, R. A. Moodt und P. L. Fox, Heterotrimeric GAIT complex drives transcript-selective translation inhibition in murine macrophages, *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32:5046-5055.
- [155] J. M. Berg und J. T. Tymoczko, *Stryer Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (6. Auflage), 2007.
- [156] J. P. Anderson, r. D. E. Walke, J. M. Goldstein, R. de Laat, K. Banducci, R. J. Caccavello, R. Barbour, J. Huang, K. Kling und M. Lee, Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease, *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281, 29739-29752.
- [157] W. Smith, R. L. Margolis, X. Li, J. C. Troncoso, M. K. Lee, V. L. Dawson, T. M. Dawson, T. Iwatsubo und C. A. Ross, Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells, *The Journal of Neuroscience*, 2005, 25, 5544-5552.

- [158] D. R. Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics: Florida, CRC Press. Boca Raton, 2003, 84.
- [159] R. Ahrends, S. Pieper, B. Neumann, C. Scheler and M. W. Linscheid, Metal-coded affinity tag labeling: a demonstration of analytical robustness and suitability for biological applications, *Analytical Chemistry*, 2009, (81), 2176-2184.
- [160] L. Mueller, T. Mairinger, G. Hermann, G. Koellensperger und S. Hann, Characterization of metal-tagged antibodies used in ICP-MS-based immunoassays, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, (206), 163-169.
- [161] S. Hoesl, B. Neumann, S. Techritz, M. Linscheid, F. Theuring, C. Scheler, N. Jakubowski und L. Mueller, Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, (29), 1282-1291.
- [162] D. J. Slamon, W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich und M. F. Press, Studies of the Her-2/Neu Proto-Oncogene in Human-Breast and Ovarian-Cancer, *Science*, 1989, 244(4905), 707-712.
- [163] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science, 1996.
- [164] S. Hoesl, B. Neuann, S. Techritz, G. Sauter, R. Simon, G. Schlüter, M. Linscheid, F. Theuring, N. Jakubowski und L. Mueller, Internal standardization of LA-ICP-MS immunoimaging via printing of universal metal spiked inks onto tissue sections, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, 31, 801-808.
- [165] A. Tefekli und M. Tunc, Future Prospects in the Diagnosis and Management of Localized Prostate Cancer, *The Scientific World Journal*, 2013, 1-9.
- [166] M. Taplin, B. Bubley, G.J., T. Shuster, M. Frantz, A. Spooner, G. Ogata, H. Keer und S. Balk, Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 1995, 332(21), 1393-1401.
- [167] T. Schlomm, A. Erbersdobler, M. Mirlacher und G. Sauter, Molecular staging of prostate cancer in the year 2007, *World Journal of Urology*, 2007, 25, (1), 19-30.

- [168] J. Luo, S. Zha, W. Gage, T. Dunn, J. Hicks, C. Bennett, C. Ewing, E. Platz, S. Ferdinandusse, R. Wanders, J. Trent, W. Isaacs und A. De Marzo, Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer, *Cancer Research*, 2002, 62, 2220-2226.
- [169] M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Prinzipie of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, 248-254.
- [170] P. Mayer, Über das Färben mit Hämatoxylin, *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*, 1891, 8, 337-341.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines ICP-MS [64] mit zwei unterschiedlichen Probeneintragssystemen.	13
Abbildung 2 Schematischer Aufbau der Dualen-Ablationszelle und Kopplung mit dem ICP-MS.....	16
Abbildung 3 Schematische Darstellung des <i>Differential Scanning Modus</i> (A) und des Linienscans (B).	17
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Umwandlung eines Single Linienscans (A) eines Lanthanidsignals in ein 2D Intensitätsprofil (B) durch die Umrechnung der Scan Zeit in den Mikrometermaßstab.	18
Abbildung 5 Immunglobulin-Klassen [71].	20
Abbildung 6 Links ist eine Computer simulierte dreidimensionale Struktur eines Antikörpers bzw. Immunglobulins [71] am Beispiel von IgG [72]; rechts ein vereinfachtes Schema gezeigt.	21
Abbildung 7 Vertikale SDS-PAGE mit schematischem Aufbau der Apparatur (links) und der Gelkassette (rechts).	24
Abbildung 8 Schematischer Aufbau des Semidry-Blottings.	25
Abbildung 9 Direkte Methode der Immundetektion.	27
Abbildung 10 Indirekte Methode der Immundetektion.	28
Abbildung 11 Zeigt den Aufbau eines Test-TMA-Gewebeschnittes. (B) Der aus 20 Kontrollbiopsieproben (gesundem Gewebe) und (A) 100 Biopsieproben von Patienten mit hoch abundanten Biomarkern (tumoröses Gewebe) besteht.....	30
Abbildung 12 Schematische Darstellung der selektive Reduktion von Antikörpern unter physiologischen Reaktionsbedingungen mit dem Reduktionsmittel (Tris(2-carboxyethyl)phosphin · HCl (TCEP) [102].	35
Abbildung 13 Kovalente MeCAT-Markierung von Antikörpern [106].	36
Abbildung 14 Schematische Darstellung der biochemischen Arbeitsabläufe um die Antikörper-Antigen-Konjugate für die LA-ICP-MS zugänglich zu machen.	46

Abbildung 15 Einfluss des Überschusses an Reduktionsmittel (TCEP) auf die Reduktion der Disulfidbrücken eines Antikörpers unter Verwendung von drei unterschiedlichen Puffern. Es wurden jeweils 666,67 pmol Antikörper mit einem molaren Überschuss von 9 bis 600 an TCEP eingesetzt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden je 2 µg (13,33 pmol) des teilreduzierten Antikörpers pro Geltasche aufgetragen und mittels 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Zeigt die Reduktion mit einem 200 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 25 mM EDTA (pH 7,4)); Spur 1: unbehandelte Antikörper, Spur 2: BSA; Spur3: Proteinstandard, Spur 4-9: 9-bis 300-facher molarer Überschuss an TCEP. (B) Zeigt die Reduktion mit einem 20 mM Tris Puffer (150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4)); Spur 1: Proteinstandard, Spur2: unbehandelte Antikörper; Spur 3-9: 9-bis 600-facher molarer Überschuss an TCEP. (C) Zeigt die Reduktion mit einem 100 mM Phosphat Puffer (2,5 mM EDTA (pH 7,2)); Spur 1: Proteinstandard, Spur 2: unbehandelte Antikörper; Spur 3: 600-facher molarer Überschuss an TCEP. 49

Abbildung 16 (A) LA-ICP-MS Intensitätsprofil des anti-Lysozym umgesetzt mit verschiedenen molaren MeCAT(Nd)-Überschüssen. (B) Die Summe der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der drei Spuren der elektrophoretisch aufgetrennten, teilreduzierten und unterschiedlich stark MeCAT-markierten anti-Lysozym-Antikörper. Die selektive Reduktion erfolgte mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP und drei verschiedenen MeCAT-Überschüssen. Mit Hilfe von einem 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen wurden die Reagenzüberschüsse entfernt. Es wurden je 3,75 µg (25 pmol) MeCAT-markierte Antikörper pro Geltasche aufgetragen. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 200 µm, Laserscangeschwindigkeit von 200 µm s⁻¹, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Laserfrequenz von 20 Hz..... 50

Abbildung 17 (A) LA-ICP-MS Intensitätsprofil des anti-Lysozym umgesetzt mit zwei unterschiedlich konzentrierten Puffern zur Optimierung der Markierungsstrategie. (B) Die Summe der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der zwei Spuren der elektrophoretisch aufgetrennten, teilreduzierten und MeCAT-markierten anti-Lysozym-Antikörper. Die selektive Reduktion erfolgte mit einem 600-fachen molaren Überschuss an TCEP und 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT. Mit Hilfe von einem 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen wurden die Reagenzüberschüsse entfernt. Es wurden je 3,75 µg (25 pmol) MeCAT-markierte Antikörper pro Geltasche aufgetragen. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 200 µm, Laserscangeschwindigkeit von 200 µm s⁻¹, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz..... 53

- Abbildung 18** Konzentration der MeCAT-modifizierten Antikörper nach Entfernung des MeCAT-Überschusses mit zwei unterschiedlichen Ultrafiltrationsröhrchen, einem 30 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Nanosep Centrifugal Filters), einem 50 kDa *Cut Off* Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra Centrifugal Devices), einer Mini-Dialyseeinheit (10-100 µL, Thermo Scientific) und einer Dialysekapsel ((0,1 ml; Roth; H448.1) zur Optimierung der Modifikation. Es wurden fünf Probenansätze mit fünf Replikaten erzeugt..... 54
- Abbildung 19** Zeigt den Einfluss der MeCAT-Modifikation auf die Spezifikation der Antikörper via Alkalische Phosphatase. Eine Dot Blot Membran wurde mit einer BSA, β -Casein und Lysozym Verdünnungsreihe versetzt und mit MeCAT-modifizierten primären anti-Lysozym-Antikörpern mit einer Konzentration von 3,33 fmol/µL (16,66 pmol) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem 1:5000 verdünntem Sekundärantikörper (Anti-Huhn IgY).55
- Abbildung 20** Zeigt die Summe der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für die Optimierung der Inkubationszeit (A) und der Gewebeschichtdicke (B) für jeden Gewebeschnitt. Die Schnitte wurden mit zwei MeCAT(^{174}Yb und ^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörpern mit einer Konzentration von 3,33 fmol/µL (16,66 pmol) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 µm, Laserscangeschwindigkeit von 250 µm s⁻¹, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ (35%) und einer Frequenz von 20 Hz. 60
- Abbildung 21** Zeigt die LA-ICP-MS 2D Intensitätsprofile von ^{165}Ho im direkten Vergleich zu den konventionellen IHC-Färbungen. Es wurden 5 µm dünne Brustgewebeschnitte detektiert, die positiv (A-C) und negativ (D) auf den anti-Her2-Antikörper sind. Die resultierenden 2D Intensitätsprofile wurden durch Variation der Laserparameter erzeugt (A-C). Die charakteristischen Bereiche der positiven Tumorareale sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Laserparameter: (A) Laserspotgröße von 180 µm, Laserscangeschwindigkeit von 200 µm s⁻¹, (B) Laserspotgröße von 80 µm, Laserscangeschwindigkeit von 100 µm s⁻¹, (C) Laserspotgröße von 40 µm, Laserscangeschwindigkeit 50 µm s⁻¹, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 63
- Abbildung 22** Zeigt (1) ein Foto der gedruckten Rechtecke und (2-5) der 2D Intensitätsprofile der gedruckten Rechtecke für die Elemente In, Tm, Lu und Nd. Die Detektion erfolgte mit folgenden Laserparametern: Spotdurchmessern: 180 µm, Geschwindigkeit: 200 µm s⁻¹, Frequenz von 20 Hz, Energie von 0,20-0,25 mJ (35%). 66
- Abbildung 23** Zeigt den Intensitätsverlauf einer LA-ICP-MS Messung über einen Messtag. Die Signalintensitätsschwankungen nach Inbetriebnahme des Messgerätes sind grün gekennzeichnet (4 h); der rote Linienscan ist die Signalintensität nach einer vier stündigen

Detektion und der blaue Linienscan zeigt eine Detektion nach 12 h. Laserparameter: Spotdurchmesser: 180 μm , Geschwindigkeit: 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Energie von 0,20-0,25 mJ..... 68

Abbildung 24 Zeigt die Intensitätsschwankungen von fünf gedruckten Rechtecke mit einer Praseodym-versetzten Tinte (^{141}Pr), sowie die Kompensation der Schwankungen durch einen gedruckten Internen Standard (^{115}In). Laserparameter: Spotdurchmesser: 180 μm , Geschwindigkeit von 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Energie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 69

Abbildung 25 Intensitätsprofil des internen Standard (In) und Indium-normalisierte Intensitätsprofile der gedruckten Kalibrierstandards ((*LA-multi-Ln-Ink*: ^{166}Er , ^{144}Pr -ink: 50 mg L^{-1}) und des internen Standards (*LA-In-Ink*: 4 mg L^{-1}). Die Detektion der Standards erfolgte simultan mit einer Laserspotgröße von 180 μm , Laserscangeschwindigkeit von 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (In: (In [cps] In[cps])). 71

Abbildung 26 Zeigt die Kalibriergerade aus der Kombination der beiden ICP-MS Detektionen. Die normierten Signalintensitäten (counts) der LA-ICP-MS Detektion der festen Proben vs die ICP-MS quantifizierten Metallmengen (pmol) pro Karo als Lösung..... 72

Abbildung 27 Zeigt die biochemischen Arbeitsschritte für den Western Blot Immunoassay. Die elektrophoretische Auftrennung von zwei unterschiedlichen Proben in einer SDS-PAGE ist links in der Abbildung 27-1gezeigt. Spur A: MeCAT(^{166}Er)-modifizierte Proteingemisch; Spur B: Lysozym als Antigen. In der Mitte (Abbildung 27-2) ist die elektrophoretische Übertragung des aufgetrennten Proteingemisches auf eine NC-Membran dargestellt. Rechts in der Abbildung 27-3 ist die Immunreaktion zwischen MeCAT(^{141}Pr)-modifiziertem Antikörper und Antigen gezeigt. 75

Abbildung 28 Schematische Darstellung der Kalibrierung (Abbildung 28-1) und internen Standardisierung (Abbildung 28-2) eines Western Blot Immunoassays. Für den *Proof-of-Principle* Versuch wurden die Proteine auf einer NC-Membran immobilisiert (siehe Abbildung 27). Nach immunologischer Reaktion wurden 6 Quadrate mit einer *LA-multi-Ln-Ink* und einer 10-60%igen Druckdichte als Kalibrierstandard (Abbildung 28-1) auf die NC-Membran gedruckt. In einem zweiten Schritt (Abbildung 28-2) wurde der interne Standard mit der *LA-In-Ink* und einer 20%igen Druckdichte über die gesamte Membran gedruckt (gelbe Bereich). 76

Abbildung 29 Schematischer Arbeitsablauf zur Detektion von MeCAT(^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörper in einem 5 μm dicken Paraffin-eingebetteten Brustkrebsgewebeschnitt

zum direkten Vergleich zweier Detektionsmethoden: LA-ICP-MS vs IHC-Färbung und zweier Standardisierungen: Iodierung vs gedrucktem Indium-Standard. 81

Abbildung 30 Zeigt das 2D Intensitätsprofil von Iod (B), In (C) und den entsprechenden IHC (A) gefärbte 5 μm dünnen Brustgewebeschnitt der positiv für anti-Her2-Antikörper war. Die charakteristischen Tumorbereiche im Gewebe wurden für eine leichte Wiedererkennung zwischen IHC und 2D Intensitätsprofil mit einem roten Kreis gekennzeichnet. (D) Zeigt die berechneten Summen der Intensitäten der internen Standards über die Scanlaufstrecke. Laserparameter: Laserspotgröße von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und einer Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 84

Abbildung 31 Zeigt 2D Intensitätsprofile eines 5 μm dünnen Her2 positiven Brustkrebsgewebeschnitt. detektiert mit Hilfe eines MeCAT(^{165}Ho)-modifizierten anti-Her2-Antikörper. (A) Zeigt die konventionelle IHC-Färbung, (B) zeigt die 2D Intensitätsprofil der Ho-Rohdaten, (C) zeigt die Indium normierten Ho-Intensitäten und (D) die Iod-normierten Ho Signale. Die charakteristischen Tumorbereiche im Gewebe wurden für eine leichte Wiedererkennung zwischen IHC und 2D Intensitätsprofil mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Die untere Abbildung zeigt eine Vergrößerung der markierten Bereiche. Laserparameter: Laserspotgröße von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 85

Abbildung 32 Vergrößerte Details der signifikanten Tumorbereiche im Brustkrebsgewebeschnitt (A) zeigt die konventionelle IHC-Färbung, (B) zeigt die 2D Intensitätsprofil der Ho-Rohdaten, (C) zeigt die Indium-normierten Ho-Signale und die (D) Iod-normierten Ho-Signale. Die charakteristischen Tumorbereiche im Gewebe wurden für eine leichte Wiedererkennung, zwischen IHC und 2D Intensitätsprofil, mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Die mit einem schwarzen Kreis gekennzeichneten Bereiche zeigen signifikante Unterschiede in der Kontrastierung der detektierten Bereiche. Laserparameter: Laserspotgröße von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 87

Abbildung 33 Schematische Darstellung des 8-fach Multiplex-Assay an einem *Tissue Micro Array* (TMA)-Gewebeschnitt mit folgenden Antikörpern (AK); anti-Erg1/2/3-AK MeCAT(^{153}Eu), anti-Androgenrezeptor-AK MeCAT(^{169}Tm), anti-prostataspezifische Membran-Antigen (PSMA)-AK MeACT(^{175}Lu), anti-AMACR-AK MeACT(^{141}Pr); einen Antikörper gegen einen potentiellen Tumormarker; anti-MUC1-AK MeCAT(^{159}Tb); einen Antikörper als absolute negativ-Kontrolle; anti-Her-2-AK MeCAT(^{174}Yb), sowie zwei

Antikörper gegen Haushaltsproteine; anti-Aktin-AK MeCAT(¹⁴⁶Nd) und anti-GAPDH-AK MeCAT(¹⁶⁶Er). Als Referenz wurden für die vier klinisch-relevanten Antikörper IHC-Färbungen angefertigt. 90

Abbildung 34 Zeigt immunhistochemische Färbungen (indirekte Methode) von 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnitten vom Prostatakarzinom-Patienten unter mittleren Reaktionsbedingungen. Es wurden Test-TMA-Gewebeschnitte eingesetzt, die aus Biopsiekontrollproben und positiven Biopsieproben bestehen; grün umrandet: 20 Biopsiekontrollproben die negativ für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper sind; rot umrandet: 100 positive Biopsieproben die positiv für Prostatakarzinom-spezifische Antikörper sind. Biopsieproben die eine signifikantere Braunfärbung zeigen sind orange markiert. Der TMA-Gewebeschnitt ist 16 x 14 mm groß und jede Biopsieprobe hat einen Durchmesser von 2 mm. Folgende Prostatakarzinom-spezifische Antikörper (1) anti-Erg1/2/3-AK; (2) anti-Androgenrezeptor-AK; (3) anti-PSMA-AK und (4) anti-AMACR-AK wurden eingesetzt. 92

Abbildung 35 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des 5 µm dünnen TMA-Gewebeschnittes eine vereinfachte Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der Gradierung in der IHC-Färbung unter mittleren Reaktionsbedingungen. Dabei steht der Grad 0 für blau, Grad 1 für grün, Grad 2 für gelb und Grad 3 für rot. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben die positiv sind (linker Abschnitt A1-8). Folgende Prostatakarzinom-spezifische Antikörper (1) anti-Erg-AK; (2) anti-Androgenrezeptor-AK; (3) anti-PSMA-AK und (4) anti-AMACR-AK wurden eingesetzt. 94

Abbildung 36 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-Erg-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8)... 97

Abbildung 37 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-Androgenrezeptor-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8). 98

Abbildung 38 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-PSMA-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8)... 99

Abbildung 39 Zeigt für die einzelnen Biopsieproben des TMA-Gewebeschnittes eine Farbkodierung (3-Farben-Skaler) der LA-ICP-MS detektierten des modifizierten anti-AMACR-Antikörpers, Indium normierten Peakflächen [counts], unter mittleren Reaktionsbedingungen. Der TMA-Gewebeschnitt enthält 20 Biopsiekontrollproben, die negativ sind (rechter Abschnitt B1-2) und 100 positive Biopsieproben, die positiv sind (linker Abschnitt A1-8)..... 100

Abbildung 40 Zeigt eine farbkodierte Darstellung (3-Farben-Saker) der erzeugten Peakflächen [counts] der LA-ICP-MS für den potentiellen Tumormarker MUC1. Der anti-MUC1-Antikörper wurde mit MeCAT(¹⁵⁹Tb)-modifiziert und in einem 8-fach Multiplex-Ansatz eingesetzt..... 102

Abbildung 41 Zeigt zwei vergrößerte Ausschnitte eines Indium-normierten Neodym-Intensitätsprofils des anti-Aktin-Antikörpers (B) zweier Biopsieproben im direkten Vergleich zum lichtmikroskopischen Bild (A). Bei den Vergrößerungen handelt es sich um die dritte und vierte Biopsieprobe (Durchmesser 2 mm) der Reihe B 2d des im Anhang gezeigten TMA-Gewebeschnittes (siehe Abbildung 73). 105

Abbildung 42 Schematische Darstellung der IHC-Färbungen im direkten Vergleich zu einem 8-fach Multiplex-Ansatz an Mausgehirngewebeschnitte. Für die IHC-Färbung wurden folgende Parkinson-spezifische Antikörpern (AK); (1) anti-NeuN-AK; (2) anti-GFAP-AK; (3) anti- α -Synuclein-AK und (4) anti-TH-AK eingesetzt. Die Färbung erfolgt im Singleplex-Ansatz durch einen Sekundärantikörper. Die LA-ICP-MS Detektion erfolgte als 8-fach Multiplex-Ansatz mit folgenden Antikörpern; (1) anti-NeuN-AK MeCAT(¹⁴¹Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(¹⁶⁵Ho); (3) anti-Syclein-AK MeCAT(¹⁵³Eu) und (4) anti-TH-AK MeCAT(¹⁵⁹Tb) zusätzliche Antikörper (5) anti-Phosphoserin-AK MeCAT(¹⁶⁹Tm); (6) anti-GAPDH-AK MeCAT(¹⁶⁶Er); (7) anti-Oxct1-AK MeCAT(¹⁷⁵Lu) und (8) anti- β -Actin-AK MeCAT(¹⁴⁶Nd) eingesetzt..... 109

Abbildung 43 Zeigt die IHC-Färbung im direkten Vergleich zu den Intensitätsprofilen der vier Parkinson-spezifischen Antikörper (AK): (1) anti-NeuN-AK MeCAT(¹⁴¹Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(¹⁶⁵Ho); (3) anti- α -Synuclein-AK MeCAT(¹⁵³Eu); (4) anti-TH-AK

MeCAT(¹⁵⁹Tb), die jeweils mit drei eingesetzten Haushaltsproteinen: (A) anti-GAPDH-AK MeCAT (¹⁶⁶Er); (B) anti-Oxct1-AK MeCAT(¹⁷⁵Lu), (C) anti-β-Actin-AK MeCAT(¹⁴⁶Nd) normiert wurden. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 150 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 µm s⁻¹ und einer Auflösung von 130 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%). 112

Abbildung 44 Zeigt die IHC-Färbung im direkten Vergleich zu den Intensitätsprofilen der vier Parkinson-spezifischen Antikörper (AK): (1) anti-NeuN-AK MeCAT(¹⁴¹Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(¹⁶⁵Ho); (3) anti-α-Synuclein-AK MeCAT(¹⁵³Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(¹⁵⁹Tb), die jeweils mit drei eingesetzten Haushaltsproteinen: (A) anti-GAPDH-AK MeCAT(¹⁶⁶Er); (B) anti-Oxct1-AK MeCAT(¹⁷⁵Lu), (C) anti-β-Actin-AK MeCAT(¹⁴⁶Nd) normiert wurden. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 50 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm s⁻¹ und einer Auflösung von 35 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%). 114

Abbildung 45 Intensitätsprofile zur Optimierung des Druckprozesse des internen Standards auf SuperFrost® plus Adhäsions-Objektträgern durch Variierung der Gelatinebeschichtungen und der Berechnung der relativen Standardabweichung (RSD), zur Beurteilung der homogenen Druck-Beschichtung. (1) ohne Gelatine mit einer Auflösung von 35 µm, (2) 2%ige Gelatinebeschichtung mit einer Auflösung von 130 µm, (3) 5%ige Gelatinebeschichtung mit einer Auflösung von 130 µm und (4) 5%igen Gelatinebeschichtung mit einer Auflösung von 35 µm. Die SuperFrost® plus Adhäsions-Objektträgern wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 50 µm und 150 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm s⁻¹ und 150 µm s⁻¹, Auflösung von 35 µm und 130 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%). 115

Abbildung 46 Zeigt für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper die Intensitätsprofile (A), die IHC-Färbung und die ¹¹⁵In-normierten Intensitätsprofile (B). (1) anti-NeuN-AK MeCAT(¹⁴¹Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(¹⁶⁵Ho); (3) anti-α-Synuclein-AK MeCAT(¹⁵³Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(¹⁵⁹Tb). Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 150 µm, einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 µm s⁻¹, Auflösung 130 µm, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%). Um die Auflösung von 130 µm auf 35 µm zu verbessern, wurde ein weiterer 8-fach Multiplex-Ansatz mit dem gedruckten internen Standard detektiert. Für die vier Parkinson-

spezifischen Biomarker wurden die normierten Intensitätsprofile erzeugt und mit den entsprechenden IHC-Färbung verglichen (siehe Abbildung 47).....	117
Abbildung 47 Zeigt für die vier Parkinson-spezifischen Antikörper die Intensitätsprofile (A), die IHC-Färbung und die ^{115}In -normierten Intensitätsprofile (B). (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-AK MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 50 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).	118
Abbildung 48 Zeigt die Intensitätsprofile der drei Haushaltsproteine. (1) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (2) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu), (3) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd) und den (4) gedruckten Internen Standard ^{115}In in zwei unterschiedlichen Auflösungen. Die Intensitätsprofile (5-7) zeigen die Anwendung der gedruckten internen Standards auf die drei Haushaltsproteine. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 150 μm und 50 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ und 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 135 μm und 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).	121
Abbildung 49 Zeigt die Immunhistochemische Färbungen (indirekte immunologische Methode) von 5 μm dünnen Mausgehirngewebeschnitten von genetisch verändertem Homotyp Maus (ho) im direkten Vergleich zum Wildtyp Maus (wt) als unbehandelte Referenz zur Untersuchung von Parkinson. Es wurden folgende Parkinson-spezifische Antikörper; anti- α -Synuclein (204)-Antikörper (Syn), anti-GFAP-Antikörper, anti-NeuN-Antikörper und anti-TH-Antikörper eingesetzt.	123
Abbildung 50 Zeigt Intensitätsprofile der vier Parkinson-spezifischen Biomarker in einem 8-fach Multiplex-Ansatz mit der Probennummer 848ho und 267wt. (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-Antikörper (AK) MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein (Syn)-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Eine detaillierte Auswertung zu den Haushaltproteine (5) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (6) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd); (7) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu); (8) anti-Phosphoserin-AK MeCAT(^{169}Tm) ist in Kapitel 3.7.2.1 beschrieben. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 150 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 130 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).	126

Abbildung 51 Zeigt Intensitätsprofile der vier Parkinson-spezifischen Biomarker in einem 8-fach Multiplex-Ansatz mit der Probennummer 848 ho und 267 wt. (1) anti-NeuN-AK MeCAT(^{141}Pr); (2) anti-GFAP-Antikörper (AK) MeCAT(^{165}Ho); (3) anti- α -Synuclein (Syn)-AK MeCAT(^{153}Eu); (4) anti-TH-AK MeCAT(^{159}Tb). Eine detaillierte Auswertung zu den Haushaltproteine (5) anti-GAPDH-AK MeCAT(^{166}Er); (6) anti- β -Actin-AK MeCAT(^{146}Nd); (7) anti-Oxct1-AK MeCAT(^{175}Lu); (8) anti-Phosphorserin-AK MeCAT(^{169}Tm) ist in Kapitel 3.7.2.1 beschrieben. Der Gewebeschnitt wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

..... 127

Abbildung 52 Zeigt die Indium-normierten Intensitätsprofile des anti-Phosphorserin-AK MeCAT(^{169}Tm) in einem 8-fach Multiplex-Ansatz mit der Probennummer 848ho und 267wt. Der Gewebeschnitt (5 x 4,5 mm) wurde mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 130 μm und 35 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ und 50 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Auflösung von 135 μm und 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).

..... 128

Abbildung 53 Zusammenfassung der berechneten relativen Standardabweichungen aus den jeweiligen zwei Peakflächen der Singleplex und Multiplex-Ansätze. 129

Abbildung 54 Fernsehtestbild für Testausdrucke zum Durchspülen der Druckdüsen, Quelle: <http://www.burosch.de/testbilder.html>. 149

Abbildung 55 Druckeinstellungen des Canon Pixma MG5150. 149

Abbildung 56 Druckeinstellungen des Canon Pixma MG5150. 150

Abbildung 57 Einfluss des Überschusses an Reduktionsmittel TCEP auf die Reduktion der Disulfidbrücken des anti-Lysozym Antikörpers unter physiologischen Reaktionsbedingungen. Es wurden jeweils 666,67 pmol Antikörper mit einem molaren Überschuss von 9 bis 1125 an TCEP eingesetzt und mittels 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Reduktion erfolgte mit einem 20 mM Tris;150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA (pH 7,4); Spur1: Proteinstandard, Spur2: BSA, Spur3: unbehandelte Antikörper; Spur4-11: 9-bis 1125-facher molarer Überschuss an TCEP. 166

Abbildung 58 Intensitätsprofile von vier Membranen nach immunologischer Reaktion mit unterschiedlich stark modifizierten anti-Lysozym (^{146}Nd)-Antikörpern. (A) Zeigt einen 9-fachen, (B) einen 25-fachen, (C) einen 45-fachen und (D) einen 60-fachen molaren Überschuss an TCEP. Die Modifikation erfolgte mit einem 20-fachen molaren Überschuss an

MeCAT(^{146}Nd). Die rechten Abbildungen zeigen die Summen der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der drei Spuren der jeweiligen Membran. Spur 1-3 enthält jeweils 3,5 pmol/ μL (0,5 μg) Lysozym und wurde mit 3,33 fmol/ μL (16,66 pmol) modifiziertem Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 μm , Laserscangeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz.	167
Abbildung 59 Intensitätsprofile von drei Membranen nach immunologischer Reaktion mit unterschiedlich stark modifizierten anti-Lysozym (^{146}Nd)-Antikörpern. (E) Zeigt einen 150-fachen, (F) einen 300-fachen, (G) einen 600-fachen molaren Überschuss an TCEP. Die Modifikation erfolgte mit einem 20-fachen molaren Überschuss an MeCAT(^{146}Nd). Die rechten Abbildungen zeigen die Summen der Intensitäten der einzelnen Rasterscan-Linien für jede der drei Spuren der jeweiligen Membran. Spur 1-3 enthält jeweils 3,5 pmol/ μL (0,5 μg) Lysozym und wurde mit 3,33 fmol/ μL (16,66 pmol) modifiziertem Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einer Laserspotgröße von 250 μm , Laserscangeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m s}^{-1}$, Laserenergie von 0.20 - 0.25 mJ und einer Frequenz von 20 Hz.....	168
Abbildung 60 Absorptionsspektrum der gelben Tinte.	169
Abbildung 61 Linearer Zusammenhang zwischen der Indium-Signalintensitätshöhen und ansteigender Laserspotgröße einer bedruckten NC-Membran als Modellversuch. Laserparameter: Laserspotgrößen: 25, 50, 100, 200, 250 μm , Frequenz von 20 Hz, Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).	170
Abbildung 62 Zeigt die Summe der Intensitäten der Lanthansignale über die Scanlaufstrecke von gedruckten Karos mit einer Multielement-gespikten unter Verwendung unterschiedlicher Druckdichten (10-100%). In dieser Abbildung sind 11 Lanthanoide (^{166}Er , ^{153}Eu , ^{165}Ho , ^{139}La , ^{175}Lu , ^{142}Nd , ^{141}Pr , ^{152}Sm , ^{159}Tb , ^{169}Tm , ^{174}Yb) gezeigt.	172
Abbildung 63 Detektierte Linearität der gedruckten Kalibrierstandards über die LA-ICP-MS. Die Abbildung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen den integrierten Peakflächen der LA-ICP-MS Daten in Abhängigkeit von der Druckdichte (^{116}Er , ^{141}Pr). Laserparameter: Laserspotgrößen: 180 μm , Laserscangeschwindigkeit 200 $\mu\text{m s}^{-1}$, Frequenz von 20 Hz, Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).	172
Abbildung 64 Detektierte Linearität der gedruckten Kalibrierstandards über die ICP-MS Analyse von Lösungen. Die Abbildung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Lanthanidmenge [pmol] in Abhängigkeit von der Druckdichte (^{166}Er , ^{141}Pr).	173

- Abbildung 65** Intensitätsprofile zur Optimierung der Signalintensitäten durch Variierung der Inkubationszeiten des modifizierten anti-Her2-Antikörper an einem 5 µm dünnem Paraffin-eingebetteten Brustgewebes mit einer Auflösung von 40 µm. (1) Inkubation: 1h bei 37°C; (2) 3h bei Raumtemperatur; (3) 3h bei 37°C. Das untere Drittel der Intensitätsprofile zeigt den Gasblank der jeweiligen Messung..... 174
- Abbildung 66** Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-Erg1/2/3-Antikörper MeCAT(¹⁵³Eu/¹¹⁵In), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parametern ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 50 µm, Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm/s, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 µm das entspricht einer Auflösung von 35 µm, einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 178
- Abbildung 67** Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-Androgenrezeptor-Antikörper MeCAT(¹⁶⁹Tm/¹¹⁵In), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (Ø) von 50µm, Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm/s, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 µm das entspricht einer Auflösung von 35 µm, einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 179
- Abbildung 68** Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-PSMA-Antikörper MeCAT(¹⁷⁵Lu/¹¹⁵In), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert Laserspotgröße (Ø) von 40 µm, Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 µm/s, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 µm das entspricht einer Auflösung von 35 µm, einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 180
- Abbildung 69** Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-AMACR-Antikörper MeCAT(¹⁴¹Pr/¹¹⁵In), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8.

Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit (v_{sp}) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , einer Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 181

Abbildung 70 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines Multiplex-Ansatzes im direkten Vergleich zum Singleplex-Ansatz der modifizierten vier Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper auf vier einzelnen bzw. einem TMA-Gewebeschnitt an der Beispiel Reihe A6. Die Abbildung ist unterteilt in (1) für den anti-Erg-Antikörper MeCAT($^{153}\text{Eu}/^{115}\text{In}$), (2) für den anti-Androgenrezeptor-Antikörper MeCAT($^{169}\text{Tm}/^{115}\text{In}$), (3) für den anti-PSMA-Antikörper MeACT($^{175}\text{Lu}/^{115}\text{In}$) und (4) für den anti-AMACR-Antikörper MeACT($^{141}\text{Pr}/^{151}\text{In}$) jeweils im Multiplex-Ansatz und Single Ansatz via LA-ICP-MS detektiert. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm , Laserscangeschwindigkeit (v_{sp}) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie mit 0,20-0,25 mJ (35%)..... 185

Abbildung 71 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-MUC1-Antikörper MeCAT($^{159}\text{Tb}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8 fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Reihen B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Reihen A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 50 μm , Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserscangeschwindigkeit (v_{sp}) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie mit 0,20-0,25 mJ (35%)..... 186

Abbildung 72 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-MUC1-Antikörper MeCAT($^{174}\text{Yb}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm , Laserscangeschwindigkeit (v_{sp}) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 187

Abbildung 73 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-Aktin-Antikörper MeCAT($^{142}\text{Nd}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt

besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 50 μm , Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 188

Abbildung 74 Zeigt ein Indium-normiertes Intensitätsprofil eines TMA-Prostatakarzinom-Gewebeschnittes detektiert mittels LA-ICP-MS, mit einem anti-GAPDH-Antikörper MeCAT($^{166}\text{Er}/^{115}\text{In}$), generiert aus einem 8-fach Multiplex-Ansatz. Der TMA-Gewebeschnitt besteht aus 20 Kontrollproben Bereich B1-2 und 100 Prostatakarzinom-Proben Bereich A1-8. Die Probe wurde vollständig mit folgenden Parameter ablatiert: Laserspotgröße (\emptyset) von 50 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 189

Abbildung 75 Zeigt die einzelnen LA-ICP-MS detektierten Biopsieproben des 5 μm dünnen TMA-Gewebeschnittes wurden farbkodiert in einer 2-Farben-Skalar, um die Abweichung der Indium-normierten Peakflächen [counts] zu einander grafisch darzustellen. Es wurde ein anti-Her2-Antikörper eingesetzt als eine einfache oder absolute negativ-Kontrolle für alle 120 Biopsieproben. Die Ablation erfolgt unter folgenden Parametern: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 190

Abbildung 76 Zeigt die einzelnen LA-ICP-MS detektierten Biopsieproben des 5 μm dünnen TMA-Gewebeschnittes wurden farbkodiert in einer 2-Farben-Skalar, um die Abweichung der Indium-normierten Peakflächen [counts] zu einander grafisch darzustellen. Es wurde ein anti-Aktin Antikörper eingesetzt als eine einfache oder absolute negativ-Kontrolle für alle 120 Biopsieproben. Die Ablation erfolgt unter folgenden Parametern: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%)..... 191

Abbildung 77 Zeigt die einzelnen LA-ICP-MS detektierten Biopsieproben des 5 μm dünnen TMA-Gewebeschnittes wurden farbkodiert in einer 2-Farben-Skalar, um die Abweichung der Indium-normierten Peakflächen [counts] zu einander grafisch darzustellen. Es wurde ein anti-GAPDH-Antikörper eingesetzt als eine einfache oder absolute negativ-Kontrolle für alle 120

Biopsieproben. Die Ablation erfolgt unter folgenden Parametern: Laserspotgröße (\emptyset) von 35 μm , einer Laserscangeschwindigkeit (vsp) von 50 $\mu\text{m/s}$, Laserspotgrößen-Überlappung von 15 μm das entspricht einer Auflösung von 35 μm , Laserfrequenz von 20 Hz und Laserenergie von 0,20-0,25 mJ (35%).....	192
Abbildung 78 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (1A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (1B) für den Biomarker NeuN zur Berechnung des T-Tests (p).....	201
Abbildung 79 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (2A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (2B) für den Biomarker GFAP zur Berechnung des T-Tests (p).....	201
Abbildung 80 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (3A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (3B) für den Biomarker TH zur Berechnung des T-Tests (p).....	202
Abbildung 81 Graphische Darstellung der integrierten IHC gefärbten Gewebeflächen (4A) im direkten Vergleich zu den LA-ICP-MS ermittelten Peakflächen (4B) für den Biomarker α -Synuclein zur Berechnung des T-Tests (p).	202

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenfassung der kalkulierten Ergebnisse zur Beurteilung der optimalen MeCAT-Markierung.	51
Tabelle 2 Zusammenfassung der kalkulierten Ergebnisse zur Beurteilung der optimalen MeCAT-Markierung.	53
Tabelle 3 Zusammenfassung der LA-ICP-MS detektierten Proteinbanden mit den gleichen Konzentrationen zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit und SNR Werte der Immunoreaktion.	57
Tabelle 4 Zusammenfassung der Markierungsgrade für die optimierte Modifikationsstrategie.	59
Tabelle 5 Zusammenfassung der analytischen Kenngrößen zur Bewertung der gedruckten Kalibriereihen.	73
Tabelle 6 Vergleich zweier Quantifizierungs Konzepte für die LA-ICP-MS und der ICP-MS.	78
Tabelle 7 Vergleich der Praseodym Quantifizierung via LA-ICP-MS und ICP-MS von MeCAT-modifizierten Antikörper-Antigen-Konjugaten auf einer NC-Membran.	79
Tabelle 8 Zusammenfassung der berechneten Kenngrößen für die Bewertung der beiden internen Standards (100-240s).	86
Tabelle 9 Zusammenfassung der SBRs für die Antikörper im 8-fach Multiplex-Ansatz nach In-Normierung.	103
Tabelle 10 Zusammenfassung der berechneten Ergebnisse für die drei Prostatakarzinom-spezifischen Antikörper: anti-Her2, anti-Aktin und anti-GAPDH.	104
Tabelle 11 Zusammenfassung der IHC-Färbung und LA-ICP-MS Ergebnissen unter mittleren Bedingungen im direkten Vergleich zu den literarischen IHC Ergebnissen, unter optimierten Bedingungen.	106
Tabelle 12 Zusammenfassung der IHC Auswertung und T-Test Bestimmung.	123
Tabelle 13 Zusammenfassung der LA-ICP-MS Auswertung mit einer Auflösung von 130 µm sowie der T-Test Berechnung für die vier Biomarker.	130
Tabelle 14 Zusammenfassung der T-Test Bestimmung im direkten Vergleich zwischen der IHC und der LA-ICP-MS Detektion.	131
Tabelle 15 Zusammenfassung der Messparameter für die ICP-MS Analyse von Lösungen.	140
Tabelle 16 Zusammenstellung der Messparameter für die LA-ICP-MS.	143
Tabelle 17 Zusammensetzung der TCEP Verdünnungsreihen und getesteten Puffer.	144

Tabelle 18 Zusammenfassung der getesteten MeCAT(¹⁶⁶ Er) und MeCAT(¹⁴⁶ Nd) Verdünnungsreihen.	145
Tabelle 19 Zusammenfassung der eingesetzten MeCAT-markierten Antikörper für die TMA-Gewebeschnitte	153
Tabelle 20 Zusammenfassung der eingesetzten MeCAT-markierten Antikörper für die Mausgewebeschnitte.	153
Tabelle 21 Zusammenfassung der Probegewebeschnitte mit den entsprechenden Antikörpern. Jede IHC erfolgte als Doppelbestimmung.	154
Tabelle 22 Zusammensetzung der Gellösung für ein SDS-PAGE-Gel.	156
Tabell 23 Zusammenfassung der eingesetzten Elektrophoretischen Systeme und Laufbedingungen.	156
Tabelle 24 Zusammenfassung der eingesetzten Puffer und Filter.	157
Tabelle 25 Zusammenfassung des verwendeten primären AK und Puffer.	158
Tabelle 26 Zusammenfassung der Proteinstoffmengenkonzentration der MeCAT-modifizierten Antikörper nach Entfernung der MeCAT-Reagenz Überschüsse mit unterschiedlichen Techniken.	166
Tabelle 27 Zusammenfassung der durchschnittlichen Markierungsgrade.	169
Tabelle 28 Zusammenfassung der ICP-MS Daten (bezogen auf 1 cm ²) der aufgelösten Indium bedruckten NC-Membran.	170
Tabelle 29 Zusammenfassung der berechneten RSD für die Einzelschuss Experimente.	171
Tabelle 30 Zusammenfassung der mittels LA-ICP-MS detektierten Signale identischer Rechtecke.	171
Tabelle 31 Zusammenfassung der Erbium Quantifizierung in pmol via ICP-MS von 3 Metall-markierten Proteinen in Lösung.	173
Tabelle 32 Tabellarische Zusammenfassung der visuellen Zuordnung Gradierung für die vier IHC gefärbten TMA-Gewebeschnitte der Bereiche A1-3.	175
Tabelle 33 Tabellarische Zusammenfassung der visuellen Zuordnung Gradierung für die vier IHC gefärbten TMA-Gewebeschnitte der Bereiche A4-6.	176
Tabelle 34 Tabellarische Zusammenfassung der visuellen Zuordnung Gradierung für die vier IHC gefärbten TMA-Gewebeschnitte der Bereiche A7-8 und B1-2.	177
Tabelle 35 Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für den Multiplex-TMA-Gewebeschnitt des Bereiches A1-3.	182

Tabelle 36 Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für den Multiplex-TMA-Gewebeschnitt des Bereiches A4-6.....	183
Tabelle 37 Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für den Multiplex-TMA-Gewebeschnitt des Bereiches A1-3.....	184
Tabelle 38 Zusammenfassung der automatisch ermittelten Peakfläche für die IHC gefärbten Proteine NeuN und GFAP der Mausgehirngewebeschnitte (ho-Typ, wt-Typ).....	193
Tabelle 39 Zusammenfassung der manuellen gezählten, IHC gefärbten Zellen der Mausgehirngewebeschnitte für den ho-Typ und den wt-Typ der Proteine TH und α -synuclein.	194
Tabelle 40 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein NeuN bei einer Auflösung von 130 μ m (ho-Typ , wt-Typ).	195
Tabelle 41 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein GFAP bei einer Auflösung von 130 μ m (ho-Typ , wt-Typ).	196
Tabelle 42 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein TH bei einer Auflösung von 130 μ m (ho-Typ , wt-Typ).	197
Tabelle 43 Zusammenfassung der berechneten Peakflächen für das Protein α -Synuclein bei einer Auflösung von 130 μ m (ho-Typ , wt-Typ).	198
Tabelle 44 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein NNe (ho-Typ , wt-Typ).....	199
Tabelle 45 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein GFAP (ho-Typ , wt-Typ).....	199
Tabelle 46 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein TH (ho-Typ , wt-Typ).	200
Tabelle 47 Zusammenfassung der Peakflächen zur Berechnung der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Singleplex- und Multiplex-Ansätze für das Protein α -Synuclein (ho-Typ , wt-Typ).....	200

8.4 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. M. Linscheid, Institut für Chemie an der Humboldt Universität zu Berlin für die Überlassung des interessanten Themas, für das Know-how und die Nutzung der Messgeräte bedanken.

Meine Dissertation wurde an der Bundesanstalt für Materialforschung und-prüfung (BAM) in der Abteilung 1.1 Anorganische Spurenanalytik unter der wissenschaftlichen Betreuung von Fachbereichsleiter Herrn Dr. Norbert Jakubowski angefertigt. Bei Dr. Norbert Jakubowski möchte ich mich herzlich für zahlreiche Diskussionen, sowie fachspezifische Anregungen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Gleichmaßen bedanke ich mich bei Dr. Larissa Müller (BAM) für die wissenschaftliche Betreuung und hilfreiche Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Für die Hilfestellung in der SDS-Gelelektrophorese möchte ich mich bei Dipl.- Ing. Sandra Techritz (BAM) bedanken.

Zudem danke ich der Proteome Factory AG unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian Scheler für die gute Kooperation. Mein spezieller Dank gilt dessen Mitarbeiter Dipl.- Ing. Boris Neumann, für die Unterstützung durch sein umfangreiches Fachwissen, sowie die Entwicklung und Umsetzung von neuen Ideen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Institut für Klinische Chemie und Herrn Prof. Guido Sauter sowie seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Ronald Simon und Christina Koop, Institut für Pathologie vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die zur Verfügungstellung der Mammakarzinom-Gewebeschnitte und Prostata-Gewebeschnitte bedanken. Zudem möchte ich mich bei Inge Brandt recht herzlich für die gute Einarbeitung in die Immunohistochemische Färbung (IHC) von Gewebeschnitten bedanken.

Für die zur Verfügungstellung der Mausgehirngewebeschnitte, sowie die spezifischen Antikörper möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Theuring und seinem Arbeitskreis bedanken. Vor allem bedanke ich mich für Anfertigung und Auswertung der IHC-Färbungen bei Frau Dr. Schwab und Frau Magbagbeolu.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern, aber vor allem meinem Ehemann, für die moralische Unterstützung und anhaltendes Verständnis, von ganzem Herzen danken.

8.5 Publikationsliste

Publikation

- „Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS", L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P. Roos and M. W. Linscheid, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2012, 27, 1311-1320.
- „Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays", S. Hoesl, B. Neumann, S. Techritz, G. Sauter, R. Simon, H. Schlüter, M.W. Linscheid, F. Theuring, C. Scheler, N. Jakubowski and L. Mueller, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2014, 29, 1282-1291.
- „Internal standardization of LA-ICP-MS immuno imaging via printing of universal metal spiked inks onto tissue sections", S. Hoesl, B. Neumann, G. Sauter, R. Simon, H. Schlüter, M. W. Linscheid, F. Theuring, N. Jakubowski and L. Mueller, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2016, 31, 801-808.

8.6 Konferenzbeiträge

Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen

- „Development and Application to metal-tagged Antibodies for immunoimaging by use of LA-ICP-MS“, S. Hardt, C. Scheler, L. Waentig, B. Neumann, M. W. Linscheid und N. Jakubowski, *European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, **2013**, Krakau
- „8-fach Multiplex-Immunoassay unter Verwendung einer neuen internen Standardisierung zur Verbesserung der qualitativen Bildqualität“, S. Hoesl, B. Neumann, M. W. Linscheid, F. Theuring, C. Scheler, N. Jakubowski und L. Mueller, ICP-MS Anwendertreffen- HZG, 2014, Geesthacht bei Hamburg

Poster auf wissenschaftlichen Kongressen

- „Development and application of metal-tagged antibodies for efficient diagnostic methods“, S. Hardt, C. Scheler, N. Jakubowski, L. Waentig und M. Linscheid, 11th European Workshop on Laser ablation (11. EWLA), 2012, Gijón, Spanien
- „Entwicklung und Anwendung einer neuartigen internen Standardisierung zur Verbesserten Bildauflösung von Gewebeschnitten in der LA-ICP-MS“, S. Hardt, B. Neumann, L. Waentig, C. Scheler, H. Schlüter, G. Sauter, M. W. Linscheid, F. Theuring und N. Jakubowski, 46. Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), 2013, Berlin Adlershof
- „Development and Application to metal-tagged Antibodies for immunoimaging by use of LA-ICP-MS“, S. Hardt, C. Scheler, L. Waentig, B. Neumann, M. W. Linscheid und N. Jakubowski, *European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, 2013, Krakau